

Universidade Federal do Espírito Santo

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Tassia Nati

**Uso da citometria de fluxo para avaliar os efeitos da
alta pressão hidrostática em *Saccharomyces
cerevisiae***

Vitória – ES
2014

Tassia Nati

Uso da citometria de fluxo para avaliar os efeitos da alta
pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal
do Espírito Santo sob a orientação da
Profa. Dra. Patricia Machado Bueno
Fernandes como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Vitória – ES
2014

Tassia Nati

Uso da citometria de fluxo para avaliar os efeitos da alta pressão hidrostática em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo sob a orientação da Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Comissão Examinadora

Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Antonio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador

Prof. Dra. Monica Montero Lomeli
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimaraes
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Profa. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes e Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes por todas as oportunidades de crescimento e desenvolvimento científico cedidas que mudaram o curso da minha vida. Obrigada pelos conselhos e pelo empenho em manter o desenvolvimento do laboratório. Serei sempre imensamente grata pelo acolhimento ao grupo do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA).

A todos os amigos do LBAA, em especial ao grupo de 2012, pelo convívio alegre e pelos seus ensinamentos. Obrigada a Alan, Eduardo, Jeferson, Jimmy, Lorena, Mainã e Oeber por me socorrerem em situações diversas e inusitadas na bancada. Ao Helber e Lorena Carnielli pela amizade e palavras de motivação. À Fernanda por todo treinamento em cultura celular e em estresse e ao Vitor pelas aulas sobre gráficos e estatística. Ao Zaca e Fábio pela companhia na bancada. Ao Frederico e à Diana pelos conselhos que sempre levarei comigo. Ao Maurício pelas risadas e por sempre me atender. À Poliana e novamente ao Vitor por me incentivarem a fazer parte do laboratório. E à Aline, Anuar, Astrid, David, Douglas, Érica, Jean, Johana, Lara, Letícia, Marlon, Melina, Paolla, Raquel, Renato, Tércio, Tathiana e Walkiria pela parceria no dia a dia.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotenologia) da UFES por oferecer uma forma justa e honesta de ingresso ao mestrado.

Aos Professores do PPG-Biotecnologia pelos ensinamentos e por serem sempre tão solícitos, cedendo espaço, reagentes e o que mais fosse necessário para o desenvolvimento de nossa pesquisa. Agradeço em especial aos Profs. Drs. Breno Valentim Nogueira, Daniel Cláudio de Oliveira Gomes e Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Aos professores Dra. Monica Montero Lomeli e Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães pela correção do trabalho e por participarem da banca.

Ao grupo de discussão sobre citometria de fluxo da Purdue, cujos participantes se tornaram meus mentores na área. Agradeço pela acessibilidade e pela ajuda de grandes nomes da citometria que me ajudaram a interpretar meus resultados. Em especial à Howard Shapiro (Cytometry Laboratory – MA – EUA) e à Gerhard Nebel-von-Caron (Alere International – Universidade de Cranfield – UK).

À Camila Ornelas e à Claudia Pantaleão pelos ensinamentos sobre citometria, pelas dicas e esclarecimentos. Não importando o dia e o horário, nunca se eximiram em me ajudar.

À Kárita e Katarina da Secretaria do PPG-Biotecnologia da UFES por atenderem tão prontamente e com tanto carinho às necessidades de todos os alunos.

À Vanuza e à Monick, que não importa o que houvesse, possibilitaram que o laboratório fosse um ambiente propício para nosso trabalho.

Aos meus pais que, mesmo com toda dificuldade, sempre investiram e acreditaram no sucesso de seus filhos, renunciando seus planos e vontades para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço ao meu irmão pelo apoio. E à minha irmã que durante todo esse tempo torceu por mim, me ouviu, aconselhou e motivou.

Ao meu namorado Jeferson, com quem eu gostaria poder dividir esse título. Agradeço pelas correções do texto, pelo encorajamento e pelas diversas repreensões que não me deixaram perder o ânimo. Obrigada por abdicar de finais de semana e feriados para me acompanhar no desenvolvimento desse trabalho.

À minha tia Viviane, tio Savinho e vovô Sávio pelo amparo.

Aos meus amigos pessoais com os quais espero poder celebrar essa vitória; em especial à Beatriz, Clarice, Ezra, Kaoru, Lorena Schneider e Moncarelli.

E às agências de fomento: CAPES, CNPq, FAPES e FINEP pelo apoio financeiro e bolsa de estudo que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi analisar os efeitos da alta pressão hidrostática (HHP) em células de leveduras, através da citometria de fluxo. Células de *Saccharomyces cerevisiae* Y440 Mat a, leu2 tiveram seu crescimento e viabilidade celular avaliados por citometria de fluxo. Após submetidas à alta pressão hidrostática, analisaram-se as alterações das características morfológicas das células. Analisaram-se também as alterações na fisiologia das células, através do uso dos corantes Brometo de Etídio, Bis-Oxonol e Iodeto de Propídio. Os resultados encontrados mostram que a Citometria de Fluxo baseada em dados óticos de espalhamento de luz pode ser utilizada como uma técnica relativa de contagem de células, mas não como uma técnica absoluta, devido à presença dos brotamentos. Os fluoróforos SYTO 9 e Iodeto de Propídio se mostraram apropriados para a análise de viabilidade celular, mostrando forte correlação com a técnica de plaqueamento. As alterações morfológicas causadas pela alta pressão hidrostática incluem reduções no tamanho e na complexidade celular das leveduras *S. cerevisiae*. Esses resultados são atribuídos aos efeitos conhecidos da alta pressão hidrostática às células, como a repressão da síntese de biomassa, maior empacotamento dos lipídios da membrana citoplasmática, interrupção do ciclo celular e degradação dos componentes internos das leveduras. Quanto à fisiologia celular notou-se, a partir de 50 MPa, o aumento do estresse celular, evidenciado pela despolarização das membranas e a partir de 150 MPa, um aumento significativo dos danos letais. A análise de fisiologia celular realizada com os fluoróforos BOX e PI quando comparada aos resultados obtidos com o kit de viabilidade celular mostrou excelentes resultados. Ambas as técnicas forneceram dados iguais de porcentagem de células mortas quanto às células vivas. A análise de fisiologia celular se destacou por discriminar duas subpopulações: vivas/saudáveis e vivas/estressadas. A citometria de fluxo forneceu, portanto, dados mais detalhados sobre os efeitos da alta pressão hidrostática quando comparada às técnicas tradicionais de análise, provendo informações sobre alterações morfológicas, fisiológicas e sobre viabilidade celular obtidas em leituras rápidas e precisas.

Palavras-chave: Alta pressão hidrostática. *Saccharomyces cerevisiae*. Membrana plasmática. Brometo de Etídio. Bis-Oxonol. Iodeto de Propídio.

ABSTRACT

The main objective of this study was to analyze the high hydrostatic pressure effects in yeast cells by flow cytometry. *Saccharomyces cerevisiae* Y440 Mat a, leu2 cells had their growth and cell viability assessed by flow cytometry. The cells were subjected to high hydrostatic pressure and their morphological characteristics were analyzed. Changes in cell physiology were observed by using Ethidium Bromide (BE), Bis-oxonol (BOX) and Propidium Iodide (PI). The results show that flow cytometry based on optical data from the light scattering can be used as a relative counting technique, but not as an absolute technique due to the presence of budding cells. SYTO 9 and PI fluorophores were suitable for analyze cell viability, showing strong correlation with the plating technique. High hydrostatic pressure caused cell size and cell complexity reduction. These results can be explained by the known HHP effects, such as repression of biomass synthesis, increased lipids packing of the cell membrane and cell cycle arrest and intracellular components degradation. It was noticed from 50 MPa an increase of cellular stress, as evidenced by the membrane depolarization and from 150 MPa was noticed an increase of cell lethal damage. Cell physiology results performed with BOX and PI fluorophores were compared to results obtained with viability analysis and showed excellent results. Both techniques provide equal percentage data of dead cells and about living cells, the analysis of cell physiology was favorable for discriminating two subpopulations: living/ healthy cells and living/ stressed cells. Flow cytometry thus provided more detail data on the effects of high hydrostatic pressure when compared to traditional techniques for cell damage analysis, by providing information on cell viability, on morphological and physiological changes, through fast and accurate readings.

Keywords: High hydrostatic pressure. *Saccharomyces cerevisiae*. Plasma membrane. Ethidium bromide. Bis-oxonol. Propidium iodide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparo da suspensão controle de células vivas e da suspensão controle de células mortas.	25
Figura 2. Preparo das suspensões celulares em diferentes proporções de viabilidade celular (100% vivas; 75% vivas; 50% vivas; 25% vivas e 0% vivas).	26
Figura 3. Curva de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> Y440 entre $0,3 - 1,1 \times 10^7$ cel/mL.....	29
Figura 4. Gráfico de regressão linear do crescimento de células de <i>S. cerevisiae</i> Y440, em YEPD líquido durante onze horas de crescimento, correlacionando a contagem pelas técnicas de Espectrofotometria (eixo y) e Câmara de Neubauer (eixo x).	30
Figura 5. Gráfico de regressão linear do crescimento de células de <i>S. cerevisiae</i> Y440, em YEPD líquido durante onze horas de crescimento, correlacionando a contagem pelas técnicas de Citometria de Fluxo (eixo y) e Câmara de Neubauer (eixo x).	31
Figura 6. Representação de células de levedura passando pelo ponto de interrogação do citômetro de fluxo.	32
Figura 7. Representação do pulso de voltagem criado quando o evento lido pelo citômetro passa pelo feixe do laser.	33
Figura 8. Exemplo de dotplot com distribuição em duas populações de larguras diferentes.	34
Figura 9. Dotplot correlacionando dados da área (FSC-A) e largura (FSC-W) dos picos resultantes da leitura do tamanho celular.	35
Figura 10. Dotplot correlacionando dados de largura dos picos relativos ao tamanho celular (FSC-W) com os dados de fluorescência (SYTO 9).	36
Figura 11. Dotplot correlacionando dados de largura dos picos relativos ao tamanho celular (FSC-W) com os dados de fluorescência (Concanavalina A conjugada à Alexa Fluor® 488).	37
Figura 12. Density plots representando a viabilidade celular de suspensões celulares de leveduras.....	40

Figura 13. Gráfico de correlação das técnicas de citometria de fluxo por kit LIVE/DEAD® FungaLight™ (representado por círculos abertos) e de plaqueamento (representado por círculos fechados) aos dados de porcentagem teórica de células vivas.	41
Figura 14. Dot plots representando a viabilidade celular de suspensões <i>S. cerevisiae</i> expostas a diferentes valores de pressão.	42
Figura 15. Análises do tamanho celular relativo de células de <i>S. cerevisiae</i> , por citometria de fluxo.	43
Figura 16. Análises da complexidade celular relativa de células de <i>S. cerevisiae</i> , por citometria de fluxo.	44
Figura 17. Mudança progressiva do estado fisiológico da membrana citoplasmática frente ao estresse.....	48
Figura 18. Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP ao sistema de transporte por bombas da membrana.	49
Figura 19. Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP à polarização da membrana.....	49
Figura 20. Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP à permeabilidade da membrana.....	50
Figura 21. Histogramas relacionando a quantidade de células com suas intensidades de fluorescência emitidas de BE, BOX e PI.	51
Figura 22. Interpretação clássica de um dotplot.....	52
Figura 23. Interpretação de plots de amostras coradas com BE, BOX e PI.....	53
Figura 24. Efeitos da HHP na fisiologia da membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i>	55
Figura 25. Investigação da viabilidade e fisiologia celular de amostras expostas à pressão atmosférica (0,1 MPa).	57
Figura 26. Investigação da viabilidade e fisiologia celular de amostras expostas à 100 MPa.....	57
Figura 27. Viabilidade e fisiologia celular de <i>S. cerevisiae</i> expostas a 0,1 e 100 MPa.	58

Figura 28. Representação da viabilidade e os estágios fisiológicos de amostras de *S. cerevisiae* expostas à pressão ambiente.59

Figura 29. Gráfico de colunas representando a viabilidade e os estágios fisiológicos de amostras de *S. cerevisiae* expostas a 100 MPa.....59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 As leveduras	13
1.2. A alta pressão hidrostática	15
1.2.1 Efeitos da alta pressão hidrostática em <i>S. cerevisiae</i>	17
1.2.2 Efeitos da alta pressão hidrostática na membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i>	18
1.3 Citometria de fluxo	19
2. OBJETIVO	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Cepa de levedura e condições de crescimento	22
3.2 Tratamento com alta pressão hidrostática (HHP)	22
3.3 Contagem de células.....	23
3.3.1 Câmara de Neubauer	23
3.3.2 Espectrofotometria	23
3.3.3 Citometria de Fluxo	24
3.4 Viabilidade celular	24
3.4.1 Técnica de Plaqueamento	24
3.4.2 Citometria de Fluxo	24
3.4.2.1 Teste do kit de viabilidade celular	25

3.5 Fisiologia celular	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Contagem de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por Citometria de fluxo.....	28
4.2 Viabilidade celular por citometria de fluxo	38
4.3 Efeito da Alta Pressão Hidrostática na morfologia celular.....	42
4.4 Efeitos da HHP na membrana citoplasmática de <i>S. cerevisiae</i>	46
4.5 Comparação entre as técnicas de viabilidade e fisiologia celular	56
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE 1	68
APÊNDICE 2	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 As leveduras

Leveduras são fungos unicelulares, eucariontes, heterotróficos, imóveis e com parede celular definida. Exibem uma grande heterogeneidade com relação ao tamanho celular, forma, cor e divisão sexual, mesmo entre indivíduos da mesma linhagem, essas características são sensíveis às condições ambientais (FERNANDES, 2008).

As leveduras são utilizadas há milhares de anos como fermento para pães e bolos, e na produção de vinho, cerveja, saquê e outros. Como o homem lida com a fermentação alcoólica há muito tempo, as leveduras são um dos microrganismos mais e melhores estudados cientificamente. As primeiras investigações que sugeriram que leveduras eram os organismos responsáveis pela fermentação foram publicados entre 1836 e 1838. E em 1861, Louis Pasteur demonstrou que as células vivas de leveduras eram as responsáveis pela conversão de açúcar em etanol e dióxido de carbono. A primeira cultura pura de levedura foi obtida por Emil Christian Hansen, em 1883. Desde então, um pequeno número de espécies do gênero *Saccharomyces* tem sido produzido em milhões de toneladas, todos os anos (DEQUIN *et al.*, 2001).

1.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de levedura e o organismo vivo mais bem estudado. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* pertence à classe Saccharomycetes, à ordem Saccharomycetales, à família Saccharomycetaceae e à subfamília Saccharomycetoidea, que engloba 26 gêneros. O gênero *Saccharomyces* possui algumas características peculiares que o caracterizam. Por exemplo, todas as espécies possuem uma alta capacidade fermentativa, se dividem por gemulação ou brotamento, num processo em que a nova célula se forma como uma pequena gêmula na célula mãe crescendo até separar-se dela (GERSHON e GERSHON, 2000).

As células de *Saccharomyces cerevisiae* têm aparência oval ou elipsoidal circundadas por uma parede celular espessa. O tamanho celular tem valores médios de 5-10 μm no diâmetro maior e de 1-7 μm no diâmetro menor. O tamanho celular de cepas industriais geralmente é maior do que o de cepas laboratoriais. A média do tamanho celular de *S. cerevisiae* também aumenta com a idade. A média de volume celular é de 29 ou 55 μm^3 para uma célula haploide e diploide, respectivamente, sendo que o tamanho celular aumenta com a idade (KREGER-VAN RIJ, 1987). Os representantes dessa espécie são habitantes de frutos.

S. cerevisiae possui diferentes fases de crescimento. Durante a primeira fase de crescimento exponencial ou fase fermentativa, a célula utiliza a fermentação da glicose como única via energética e a taxa de crescimento é alta. A presença da glicose reprime a expressão dos genes que codificam enzimas da via respiratória e de genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de outras fontes de carbono. Quando a glicose do meio é exaurida, o ciclo celular é interrompido e genes envolvidos na via aeróbica do metabolismo são induzidos. Começa então a segunda fase exponencial ou fase respiratória. Durante esta fase, a célula utiliza outras fontes de carbono para gerar energia. O etanol produzido na fase fermentativa serve como importante fonte de carbono para as células na fase respiratória. Ao contrário da fase fermentativa, durante a fase respiratória, a célula depende de oxigênio. Ao esgotar todas fontes de carbono disponíveis, as células mudam seu metabolismo e entram em estado de latência até que as condições ótimas de crescimento seja restabelecidas. Nessa fase estacionária, as células acumulam açúcares de reserva como glicogênio e trealose e proteínas de defesa conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps) (FELDMANN, 2012).

S. cerevisiae vem sendo amplamente utilizada na indústria biotecnológica. Isso se deve a sua não-patogenicidade, rápida taxa de crescimento, fácil manipulação, à sua alta capacidade de produzir etanol, a sua tolerância a baixos valores de pH, à alta concentração de açúcar e de etanol, a sua resistência a inibidores presentes nos hidrolisados de biomassa e ao seu crescimento anaeróbico (NEVOIGT, 2008).

Além de possuírem curto ciclo de vida e serem facilmente cultivadas, as leveduras são facilmente manipuladas geneticamente. Compartilham com eucariotos superiores, inclusive, diversos mecanismos conservados, dentre eles os

mecanismos de replicação, recombinação, divisão celular e resposta celular a estresses. Esses fatores fizeram que além de apresentar vasto uso industrial, a levedura *S. cerevisiae* seja um excelente organismo modelo. É considerado que não existe nenhum outro organismo eucarioto melhor estudado e caracterizado por análises bioquímicas, celulares, moleculares e genéticas (FERNANDES, 2005). *S. cerevisiae* tornou-se um excelente modelo de célula eucariota para a compreensão da fisiologia da célula eucariótica e no estudo da resposta ao estresse (HOHMANN, 2002). *S. cerevisiae* foi também o primeiro organismo eucarionte modelo a ter todo o seu genoma sequenciado (GOFFEAU *et al.*, 1996), revolucionando as pesquisas moleculares.

1.2. A alta pressão hidrostática

Na Biosfera terrestre, as pressões variam de 0,1 MPa a 110 MPa. Habitats terrestres apresentam pressões de 1 atmosfera [1 atm = 0,101 megapascal (MPa)] ou menos e correspondem a menos que 1% do volume total da biosfera (SOMERO, 1992). Enquanto os oceanos que cobrem aproximadamente 70% da superfície terrestre possuem uma profundidade média de 3800 m e pressão de 38 MPa. Esses dados mostram que altas pressões hidrostáticas (HHP) caracterizam grande parte da biosfera. A região de maior profundidade conhecida da Terra são as Fossas Marianas, localizadas no Oceano Pacífico. Essa região possui aproximadamente 11.000 m de profundidade (~110 MPa). Apesar desta condição aparentemente hostil, uma enorme biodiversidade de bactérias piezofílicas têm sido observadas prosperando sob estas pressões (AERTSEN *et al.*, 2009). Algumas leveduras marinhas habitam mares com profundidade de até 4000 m (WALKER, 1998). Células de organismos terrestres também podem ser naturalmente expostas a altas pressões, como por exemplo, as presentes em articulações de animais ou em tecidos vasculares de plantas. Nesses, as células podem experimentar pressões próximas a 20 MPa e 100 MPa, respectivamente (ELO *et al.*, 2000; PETERS, *et al.*, 2000). Muitas células e organismos conseguem viver sob pressões hidrostáticas extremamente altas, apesar dos profundos efeitos exercidos pela pressão em várias estruturas e funções celulares. Altas pressões hidrostáticas têm ganhado uma

grande importância biotecnológica na última década devido à sua aplicação à descontaminação dos alimentos (ROTHSCHILD e MANCINELLI, 2001).

A HHP tem a capacidade de inativar microrganismos, bem como enzimas responsáveis pela redução da vida útil de um produto. Hite, em 1899, demonstrou que os microrganismos que contaminam o leite podiam ser destruídos com aplicação de pressão hidrostática. O método tradicional de descontaminação de alimentos utilizado ainda é através de altas temperaturas. Entretanto a HHP apresenta diversas vantagens quando comparado à descontaminação por altas temperaturas, visto que a última geralmente causa mudanças nas características organolépticas originais dos alimentos, criando alterações nutricionais, na cor, flavor, degradação de várias vitaminas e textura (LOPES *et al.*, 2010). É necessário ainda compreender como são as respostas dos microrganismos à pressão e quais fatores podem influenciar na tolerância adquirida contra a pressão hidrostática.

Além do uso na descontaminação de alimentos, pressões mais amenas vêm sendo indicadas para otimização de processos industriais. Recentemente, foi demonstrado que a pressão de 50 MPa tornou o processo fermentativo da glicose em etanol por *S. cerevisiae* mais rápido e ainda aumentou o rendimento, quando comparado com a fermentação feita por células à pressão ambiente (BRAVIM *et al.*, 2013). HHP vem sendo aplicada também para desagregação de proteínas, na preparação de vacinas virais, na modulação de conversões enzimáticas, dentre outros (AERTSEN, 2009).

Paralelamente à sua aplicação industrial, a HHP tem sido amplamente utilizada como modelo de estresse em estudos científicos, inclusive auxiliando na compreensão dos danos e resposta de organismos ao estresse. A pressão é uma variável termodinâmica que pode causar aos organismos efeitos semelhantes aos causados por outros tipos de estresses, tais como a temperatura, o etanol e o estresse oxidativo (BRAVIM *et al.*, 2010). A HHP pode ser considerada um sistema de estresse preciso e reprodutível e seus resultados são mais fáceis de interpretar, pois causa alterações em apenas uma variável, no volume celular, enquanto os obtidos através da variação da temperatura envolvem alterações no volume e alterações térmicas. A HHP torna-se, assim, uma ferramenta útil para a compreensão de uma variedade de processos físico-químicos que ocorrem em células e organismos expostos a estresse.

1.2.1 Efeitos da alta pressão hidrostática em *S. cerevisiae*

S. cerevisiae habitam tecidos vegetais à pressão atmosférica. Entretanto, por ser um organismo modelo, as consequências do estresse por alta pressão hidrostática neste microrganismo vêm sendo amplamente estudadas. Estudos de expressão gênica global em resposta a HHP demonstraram que dos seus 6.200 genes conhecidos, aproximadamente 150 são induzidos e 150 são reprimidos mais que o dobro por este estresse. A maioria dos genes induzidos pela HHP têm funções desconhecidas (FERNANDES *et al.*, 2004; Bravim *et al.*, 2013).

A viabilidade celular decresce durante o tratamento com alta pressão hidrostática e essa mortalidade é mais pronunciada quando as células são submetidas a pressões acima de 100 MPa. Pressões de 50 MPa não são suficientes nem para matar nem para alterar a morfologia celular de leveduras *S. cerevisiae*. Mesmo não apresentando histórico de presença de *S. cerevisiae* em ambientes com alta pressão hidrostática, esses organismos apresentam diversos genes e proteínas induzidos por pressão. Isso se dá, provavelmente, porque a pressão hidrostática compartilha efeitos semelhantes aos causados por outros estresses, para os quais já há mecanismos adaptativos. A pressão hidrostática interfere na arquitetura e na divisão celular, afetando a estrutura da parede celular, fluidez da membrana e muitas organelas intracelulares (FERNANDES *et al.*, 2004). Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das células de levedura sugerem que a pressão hidrostática induz mudanças na parede celular e no citoesqueleto, e consequentemente, nas membranas e organelas celulares (FERNANDES *et al.*, 2001). Estudos mostram que a HHP induz a expressão do gene HSP12 (FERNANDES *et al.*, 2004) o qual codifica uma proteína relacionada à flexibilidade da parede celular e da membrana plasmática, sugerindo que esse estresse afete diretamente a integridade dessas estruturas (MOTSHWENE *et al.*, 2004).

1.2.2 Efeitos da alta pressão hidrostática na membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*

As altas pressões alteram diversos componentes celulares de modo a favorecer uma configuração mais compacta. Aliado à redução do volume celular, ocorrem alterações na membrana citoplasmática de células expostas à pressão. Essas mudanças são caracterizadas por um nível maior de organização estrutural, a alta pressão ordena a bicamada fosfolipídica fazendo com que os ácidos graxos fiquem dispostos mais firmemente. Nesse sentido, as alterações nas distâncias intermoleculares e dimensões de bicamadas têm sido relatadas, indicando uma redução na distância entre as cadeias lipídicas e aumento da espessura da membrana. Estas alterações resultam numa diminuição do volume total e na fluidez da membrana (HÜBNER *et al.*, 1990). As possíveis consequências dessa nova disposição são a interferência nos processos de difusão e o comprometimento da estrutura pode afetar a atividade das proteínas de membrana (MENTRÉ e HUI BON HOA, 2001).

Para aumentar sua piezorresistência, as células podem controlar a fluidez de suas membranas, aumentando a concentração de ácidos graxos insaturados. O aumento na quantidade de ácidos graxos insaturados é confirmado pela indução do gene OLE1 (Fernandes *et al.*, 2004), que codifica uma enzima que introduz ligações duplas nas cadeias de ácidos graxos. A maior instauração pode compensar a compactação da membrana, garantindo um estado líquido-cristalino funcional. As membranas com maior número de insaturações apesar de serem mais desordenadas, são mais resistentes à HHP, visto que suas regiões desordenadas são menos acessíveis às moléculas de água (MENTRÉ e HUI BON HOA, 2001).

Proteínas citoplasmáticas sofrem efeitos da pressão hidrostática. São necessárias pressões acima de 500 MPa para provocar desnaturação, mas pressões menores, de 20-40 MPa, já são suficientes para induzir importantes modificações conformacionais capazes de levar a alterações na funcionalidade das proteínas (MOLINA-GARCÍA, 2002). A pressão força a inserção de moléculas de água entre domínios hidrofóbicos ou eletricamente carregados das proteínas e promove uma redução do volume ocupado pela macromolécula. Gera-se assim, um enfraquecimento das interações iônicas e hidrofóbicas, tanto entre complexos

proteicos, quanto na estrutura da própria proteína. Concomitantemente aos efeitos gerais às proteínas citoplasmáticas, as bombas de Sódio e Potássio são inibidas reversivelmente por pressões abaixo de 150 e 250 MPa, dependendo da espécie. (MENTRÉ e HUI BON HOA, 2001; SILVA *et al.*, 2001)

1.3 Citometria de fluxo

A definição de Citometria compreende qualquer processo realizado para medir características físicas e químicas das células biológicas. A citometria de fluxo, por sua vez, realiza as medidas enquanto células fluem através do instrumento em uma corrente de fluido. O citômetro de fluxo nada mais é do que um microscópio adaptado no qual as células têm suas características físicas e/ou químicas analisadas individualmente pelo equipamento enquanto fluem em corrente. O equipamento é composto por 3 elementos; o sistema fluídico, sistema óptico e o sistema eletrônico. O citômetro de fluxo realiza em uma única leitura, a análise de múltiplos parâmetros celulares, incluindo dados sobre o espalhamento da luz e de emissão de fluorescência. O espalhamento da luz fornece dados sobre tamanho e complexidade celular relativa possibilitando a separação de todos os eventos lidos em populações com características semelhantes. Essa separação permite que sejam realizadas análises de amostras heterogêneas, com organismos ou células diferentes, preservando ainda assim a obtenção de dados individualizados. A conjugação de corantes fluorescentes diretos ou ligados a anticorpos possibilita a detecção de diversos alvos presentes na superfície celular ou no citoplasma celular, permitindo também a detecção de subpopulações. Embora as células de mamíferos, plantas, algas, fungos e bactérias componham a maioria das análises feitas por citometria de fluxo, outras partículas, como núcleos, cromossomos ou pequenos fragmentos e organelas podem também ser estudadas. Acredita-se que qualquer material possa ser analisado por citometria, desde que haja uma preparação adequada da amostra (SHAPIRO, 2004; MÜLLER e NEBE-VON-CARON, 2010).

O princípio do funcionamento do citômetro de fluxo é simples: a amostra é succionada e segue em uma corrente de fluxo fluídica até o ponto de medição ou ponto interrogatório. Nesse ponto, a corrente de células é interceptada um feixe de luz, proveniente de uma ou mais fontes de excitação (geralmente laser). A luz é

dispersada e a fluorescência é emitida a partir das células. Selecionando os corantes ou sondas apropriadas pode-se realizar diversas análises como viabilidade celular, medição da atividade metabólica, energização de membrana, concentração de DNA e RNA, permeabilidade da membrana, detecção do estágio do ciclo celular e outros (RIESEBERG *et al.*, 2001).

As vantagens da citometria de fluxo frente a outras técnicas de análise celular são vastas. Elas incluem rapidez de análise, avaliação de um grande número de células por leitura, capacidade de examinar amostras heterogêneas obtendo resultados independentes para cada população, redução da subjetividade na análise, além de uma visão muito mais próxima da condição real da população estudada, isso porque as células são analisadas uma a uma, as medidas não são feitas com base na média das condições da amostra (HEWITT e NEBE-VON-CARON, 2001).

A citometria vem sendo aplicada com sucesso em diversas áreas, o uso é crescente e comum em locais tão diversos como laboratórios clínicos e cervejarias. A análise tradicional por métodos indiretos, baseados em cultura padrão de amostras microbiológicas são demorados. Análise de concentração celular por plaqueamento, por exemplo, demora no mínimo 36 horas para ser realizada. Em procedimentos de fermentação em indústria de bebidas (cerveja, vinho e outros) há a necessidade de uma análise rápida e com informação direta sobre o estado fisiológico dos microrganismos para a alteração imediata dos parâmetros do processo (BOYD *et al.*, 2002). Além disso, o método de contagem por plaqueamento detecta apenas as células capazes de formar colônias sob as condições do meio, ignorando a presença de células vivas estressadas que não formam colônias, que podem estar metabolicamente ativas ou não. Sabe-se também que os meios de cultura padrões de laboratório raramente se assemelham condições ambientais naturais, assim o resultado tradicional por plaqueamento pode ser um resultado destoante da realidade (SILVA *et al.*, 2004).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da alta pressão hidrostática em células de leveduras *S. cerevisiae* utilizando o método de citometria de fluxo.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar técnicas de contagem celular e viabilidade celular por citometria de fluxo;
- Analisar por citometria de fluxo os efeitos da HHP na morfologia celular de *S. cerevisiae*;
- Avaliar os efeitos da HHP na membrana citoplasmática e consequente metabolismo celular de *S. cerevisiae* por citometria de fluxo;
- Analisar por citometria de fluxo os efeitos da HHP na fisiologia celular de *S. cerevisiae*;
- Criar protocolos para futuras análises feitas pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio - UFES.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepa de levedura e condições de crescimento

A cepa de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho foi a Y440 Mat *a*, *leu2* cedida pelo Prof. Dr. James Riley Broach, Princeton University, EUA. As células estão estocadas a -80°C em 15% de glicerol na biblioteca do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (Núcleo de Biotecnologia - UFES). Uma alíquota foi retirada da biblioteca, plaqueada em meio YEPD sólido (2% glicose, 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% ágar) e incubada por 48 horas a 28°C. Decorrido o tempo, preparou-se um pé-de-cuba, selecionando uma população da placa e crescendo-a em meio YEPD líquido (2% glicose, 1% extrato de levedura, 2% peptona) a 28°C sob agitação orbital (160 rpm), até atingir a fase estacionária de crescimento ($>5 \times 10^8$ células/mL). Cada pé-de-cuba foi utilizado por até 7 dias, armazenado a 4°C. A suspensão celular de trabalho, exceto a do experimento de crescimento celular, foi preparada através do crescimento por 16 - 18 h de uma alíquota do pé-de-cuba em novo meio YEPD líquido a 28°C com agitação até atingir a fase exponencial de crescimento (aproximadamente 1×10^7 células/mL).

3.2 Tratamento com alta pressão hidrostática (HHP)

O aparato para aplicação de alta pressão hidrostática utilizado neste trabalho foi o mesmo descrito por Palhano *et al* (2004). A suspensão celular foi colocada em um tubo de Teflon o qual foi hermeticamente fechado e alojado no interior do cilindro de pistão de Cobre-Berílio (célula de pressão). A pressão foi alcançada por compressão do tubo de Teflon na célula de pressão, através de uma prensa hidráulica operada manualmente (Eureka, MG, Brasil). A pressão celular interna foi medida com um manômetro mecânico calibrado (Woler, Brasileira, MG, Brasil). As células de leveduras foram submetidas aos valores de pressão de 50, 100, 150 e 200 MPa durante 30 min, na ausência de bolhas de ar e à temperatura ambiente. O tempo necessário para atingir e liberar a pressão desejada foi sempre inferior a 1 min.

3.3 Contagem de células

Em um erlenmeyer de 250 mL, foram acrescentados 60 mL de meio YEPD líquido e inoculou-se um volume de pé-de-cuba suficiente para obter uma concentração de 0,03 células/mL. Os erlenmeyers foram incubados a 28°C, sob agitação.

Em tempos pré-determinados (0, 1, 3, 5, 8 e 11 horas após o inóculo), alíquotas de 4 mL foram coletadas da cultura em crescimento, lavadas e ressuspensas em tampão. O procedimento de lavagem foi feito centrifugando a alíquota a 10.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em tampão Tris 50 mM, pH 7.2 filtrado. Essa etapa foi repetida para garantir maior limpeza das amostras.

Após a lavagem, a concentração celular da alíquota foi avaliada através da contagem das células em Câmara de Neubauer, por Espectrofotometria e por Citometria de Fluxo.

3.3.1 Câmara de Neubauer

A contagem através da Câmara de Neubauer ou hemocítômetro foi realizada utilizando lamínula e câmara melhorada da Laboroptik (Lancing, UK). Conforme necessidade, as suspensões celulares foram diluídas e posteriormente suas alíquotas foram pipetadas na câmara. A visualização das células foi viabilizada por microscopia ótica (Leica – Wetzlar, DE). Células com brotamentos de tamanho igual ou superior a 50% do tamanho da célula mãe, foram contabilizadas como duas células. O protocolo desse procedimento está detalhado no Apêndice 1, anexado ao fim desse trabalho.

3.3.2 Espectrofotometria

Realizou-se a leitura da absorvância a 620 nm em um espectrofotômetro Biomate 3 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O tampão Tris 50 mM, pH 7,2 foi utilizado como branco para a zeragem do equipamento.

3.3.3 Citometria de Fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas em um Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) equipado com dois lasers de excitação, um na faixa do azul de 20 mW (488 nm) e um na faixa do violeta de 50 mW (405 nm), ambos com três canais de detecção. A população de leveduras foi detectada com base nas suas propriedades intrínsecas de espalhamento de luz (FSC e SSC), confirmadas conforme descrito no Apêndice 2.

3.4 Viabilidade celular

3.4.1 Técnica de Plaqueamento

A viabilidade celular foi avaliada pelo método tradicional de plaqueamento. Para tal, plaqueou-se diluições apropriadas das amostras em placas de Petri contendo meio YEPD sólido. Após incubação das placas por 48 h a 28°C, a sobrevivência celular foi determinada comparando a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de células tratadas com a contagem da amostra controle.

3.4.2 Citometria de Fluxo

A viabilidade celular analisada por citometria de fluxo foi realizada através do uso do kit LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O kit é composto por dois fluoróforos: SYTO 9 - corante fluorescente de ácido nucleico que cora tanto células vivas quanto células mortas e Iodeto de Propídio (PI) - corante fluorescente que também cora ácidos nucleicos penetrando apenas em células com a membrana danificada.

Para a análise, coletou-se uma alíquota de 1 mL da amostra em um microtubo. A alíquota foi lavada e diluída a 1×10^6 células/mL em tampão Tris 50 mM (pH 7,2): centrifugação a 10.000 rpm por 3 minutos, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em tampão (x 2).

O processo de coloração foi realizado adicionando 1 μ L de SYTO 9 e 1 μ L de PI ao microtubo com a amostra previamente lavada. Após a adição dos corantes, o microtubo foi gentilmente vortexado, envolvido em papel alumínio e incubado a 37 °C por 15 minutos.

Para a leitura, o equipamento foi configurado para emitir o laser azul (488 nm) e coletar a fluorescência através dos detectores BL1 (530/30 nm) e BL3 (640 nm).

3.4.2.1 Teste do kit de viabilidade celular

O kit de viabilidade celular foi testado previamente corando suspensões celulares com viabilidade celular conhecida. Para isso, preparou-se uma amostra padrão de células vivas e uma amostra padrão de células mortas.

Para obter a amostra de células vivas coletou-se uma alíquota de uma cultura de leveduras em fase logarítmica de crescimento. A suspensão celular foi lavada e ressuspensa em tampão Tris 50 mM, pH 7,2 (Figura 1).

A amostra de células mortas foi preparada ressuspensando um pellet de células em álcool Isopropanol 70% por uma hora. Decorrido o tempo, a suspensão foi lavada e ressuspensa em Tris 50 mM, pH 7,2 (Figura 1).

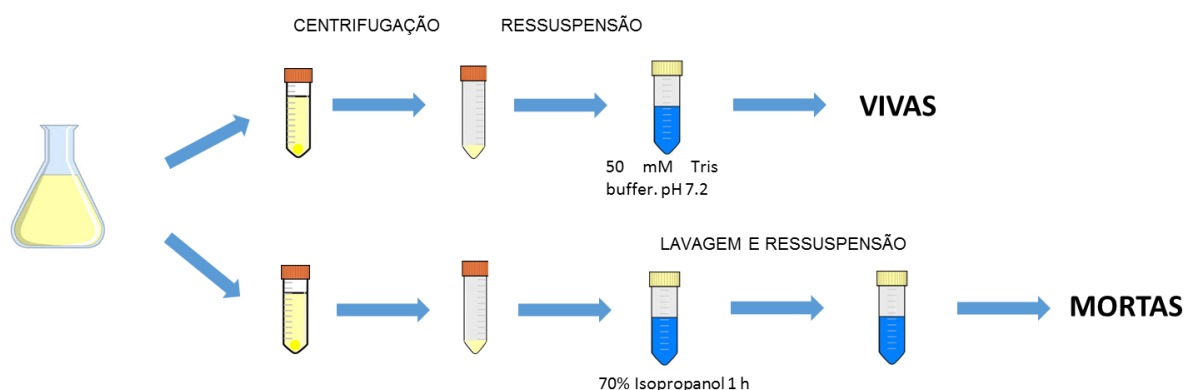


Figura 1. Preparo da suspensão controle de células vivas e da suspensão controle de células mortas. O controle vivo foi preparado a partir de alíquota retirada de uma cultura celular em fase logarítmica de crescimento. A alíquota foi centrifugada e ressuspensa em Tris 50 mM, pH 7,2 (2 x). O controle morto foi preparado retirando uma alíquota da mesma cultura, centrifugando-o e ressuspensando em

Isopropanol 70%. Após uma hora, a suspensão foi centrifugada e ressuspensa em Tris 50 mM, pH 7,2.

A partir desses controles de células vivas e mortas, preparou-se cinco suspensões com proporções de viabilidade diferentes (0/100%, 25/75%, 50/50%, 75/25%, 100/0%). A viabilidade real dessas suspensões foi analisada por citometria e por plaqueamento (Figura 2).



Figura 2. Preparo das suspensões celulares em diferentes proporções de viabilidade celular (100% vivas; 75% vivas; 50% vivas; 25% vivas e 0% vivas). Em seguida as suspensões tiveram a viabilidade celular real determinada pelas técnicas de plaqueamento e por citometria de fluxo.

3.5 Fisiologia celular

A avaliação da fisiologia celular pós-estresse foi realizada utilizando os corantes fluorescentes: Brometo de Etídio - BE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), Bis-oxonol trimetina (ácido 1,3-dibutilbarbitúrico) - BOX (Invitrogen, Molecular Probes - Eugene, OR, EUA) e Iodeto de Propídio - PI (Invitrogen, Molecular Probes - Eugene, OR, EUA).

Após o tratamento com alta pressão hidrostrática, coletou-se uma alíquota de 1 mL da suspensão celular em um microtubo. A alíquota foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensa em tampão Tris 50 mM, pH 7.2 filtrado. O processo de lavagem foi realizado duas vezes.

Após a ressuspensão da alíquota, diluída a 1×10^6 células/mL, em tampão Tris 50 mM (pH 7,2). Em seguida lavagem e diluição, a amostra foi coradas com os fluoróforos. Nas primeiras análises, os corantes foram utilizados separadamente. Com o estabelecimento de uma compensação adequada, as amostras foram coradas com a mistura dos três corantes. Em todos os casos, houve alguma sobreposição espectral entre as fluorescências emitidas pelos corantes, por isso, foi configurada a compensação do sistema para eliminar interferências.

As concentrações de BE, BOX e PI utilizadas foram de 5, 6 e 3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As medidas de fluorescência foram feitas por citometria de fluxo. Utilizou-se o laser de argônio com excitação de 488 nm. O software foi configurado para detectar emissões captadas por três canais de fluorescência: BL1 (530/30 nm), BL2 (575/24 nm) e BL3 (640 nm). Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.6 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, seus resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As técnicas de contagem de células tiveram a sua correlação avaliada por coeficiente de correlação de Pearson e a relação funcional entre elas foi analisada por regressão linear simples. Todos os gráficos foram confeccionados através do software GraphPad Prism (versão 5.0, GraphPad, Califórnia, EUA) utilizando média e desvio padrão para produção das barras e cálculo de erros.

4. RESULTADOS

4.1 Contagem de células de *Saccharomyces cerevisiae* por Citometria de fluxo

O presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de aplicar a técnica de citometria de fluxo a estudos sobre os efeitos da HHP à *S. cerevisiae*, focando principalmente nos danos causados à membrana celular. Para tal foi necessário realizar diversos testes objetivando adequar o aparelho para executar a leitura de células de leveduras, visto que trata-se de um equipamento normalmente utilizado para analisar células humanas. Como estratégia de abordagem ao tema, iniciou-se pelas medidas de contagem de células. Em laboratórios de pesquisa, a contagem de células de leveduras é fundamental na identificação da fase de desenvolvimento da cultura. Em processos fermentativos, sua aplicação está no ajuste das taxas de adição de leveduras, além do monitoramento do progresso da fermentação (HEWITT e NEBE-VON-CARON, 2001).

A contagem tradicional por hemocitômetro (Câmara de Neubauer) é lenta, devido a passos como a limpeza e preparo da lâmina e lamínula, diluição apropriada da amostra, focalização adequada do microscópio e contagem individual das células. Além disso, todo o processo deve ser repetido caso haja formação de bolhas na câmara, quantidade de células fora da faixa ideal e sub ou super preenchimento da câmara. Na citometria de fluxo, são necessárias apenas a lavagem e diluição da amostra. O equipamento lê de 25 a 1.000 $\mu\text{L}/\text{minuto}$, o que corresponde a até um milhão de células por minuto, mantendo a diluição mínima 10^6 cel/mL . As leituras por citometria levam cerca de 12 segundos. A espectrofotometria, apesar de rápida e prática, requer maior volume de amostra.

A levedura Y440 tem um tempo de duplicação aproximado de duas horas. O crescimento da cultura foi avaliado durante onze horas de experimento. A maioria dos estudos realizados por nosso grupo utiliza a cultura em fase log de crescimento, com a concentração celular de trabalho padronizada a $\sim 1 \times 10^7 \text{ cel/mL}$. A escolha da concentração de partida no tempo zero foi feita de forma a garantir que pontos próximos a concentração de trabalho estivessem na curva (Figura 3).

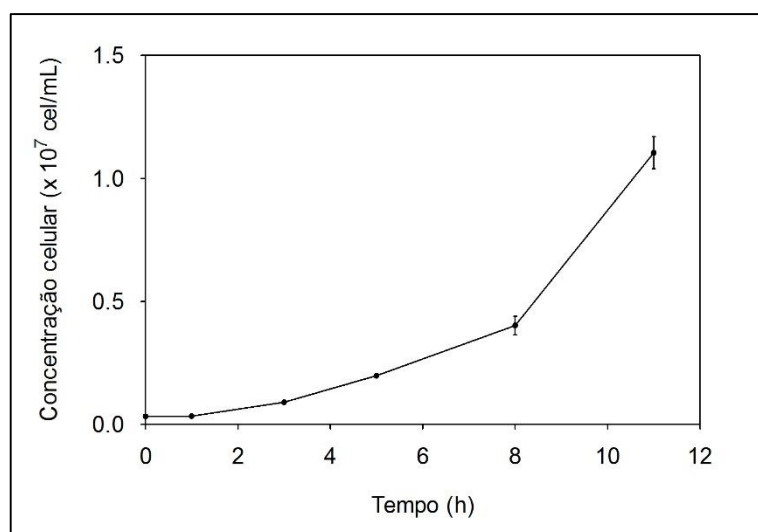


Figura 3. Curva de crescimento da levedura *S. cerevisiae* Y440 entre $0,3 - 1,1 \times 10^7$ cel/mL. Crescimento analisado pelo método tradicional por Câmara de Neubauer. Os pontos referem-se às médias das triplicatas. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das amostras.

A avaliação da concentração celular foi realizada em todos os pontos pelos três métodos de contagem. Os resultados obtidos pela espectrofotometria e pela citometria foram plotados em relação aos da câmara de Neubauer.

Os resultados de contagem por câmara de Neubauer e espectrofotometria apresentaram correlação linear positiva forte (R de Pearson igual a 0,9987) estatisticamente significativa ($\alpha=0,05$) sugerindo a existência de uma relação funcional entre as duas variáveis. Para determinar a função que exprime esse relacionamento, realizou-se a análise de regressão linear simples (Figura 4). Com um r^2 de 0,9908, a reta formada mostra a equação da relação entre os dois métodos de contagem.

É importante salientar que ao apresentar a concentração de 1×10^7 cel/mL, a absorvância medida ou densidade óptica (DO_{620nm}) média foi de 0,38 e que esses resultados são exclusivos para a cepa Y440, nas condições de crescimento e análise supracitadas, pois a absorvância medida é inerente às características de cada cepa. Isso inclusive causa outra desvantagem da técnica, por não ser uma medida absoluta e por ser dependente das características das células e do seu grau de agregação, é sempre necessário produzir uma curva de crescimento para cada nova cepa utilizada.

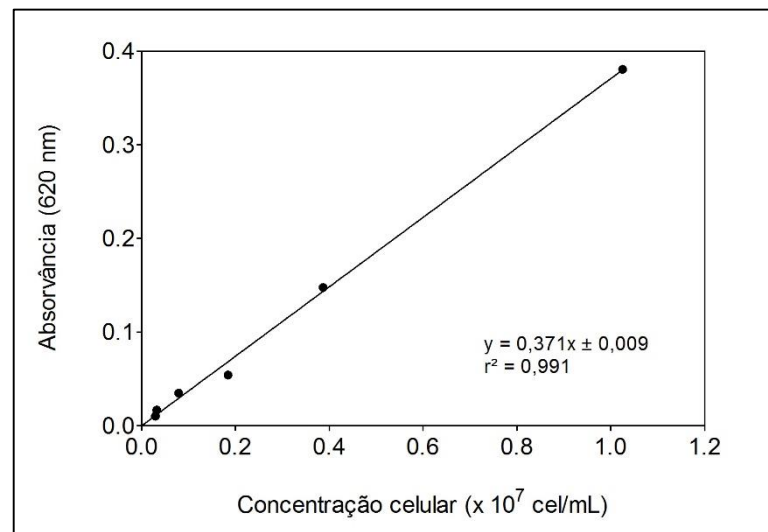


Figura 4. Gráfico de regressão linear do crescimento de células de *S. cerevisiae* Y440, em YEPD líquido durante onze horas de crescimento, correlacionando a contagem pelas técnicas de Espectrofotometria (eixo y) e Câmara de Neubauer (eixo x). Os pontos referem-se a média de triplicatas de experimentos independentes.

Os resultados das técnicas de Citometria de Fluxo e Câmara de Neubauer também apresentaram correlação positiva forte (R de Pearson igual a 0,9993). Mostrando também uma relação funcional entre as duas, evidenciada inclusive pela análise de regressão linear simples (Figura 5). Com um r^2 de 0,9967, a reta obtida possibilita a relação entre os valores obtidos na citometria com os resultados obtidos pela contagem em câmara de Neubauer.

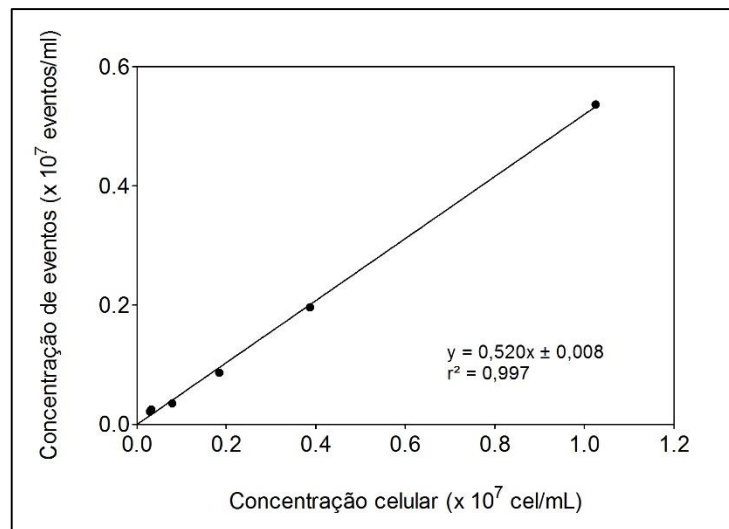


Figura 5. Gráfico de regressão linear do crescimento de células de *S. cerevisiae* Y440, em YEPD líquido durante onze horas de crescimento, correlacionando a contagem pelas técnicas de Citometria de Fluxo (eixo y) e Câmara de Neubauer (eixo x). Os pontos referem-se a média de triplicatas de experimentos independentes.

Apesar de possibilitar uma contagem relativa, a contagem feita por citometria não reproduz fielmente os resultados obtidos através da Câmara de Neubauer, apresentando sempre resultados inferiores aos da técnica tradicional. A primeira tentativa para solucionar essa diferença foi levar a amostra ao banho de ultrassom antes da leitura, acreditando que a subestimação fosse causada por possíveis aglomerados de células. Entretanto, nenhum dos tratamentos por banho de ultrassom por 1, 3, 5, 15, 30 e 60 minutos foi suficiente para resolver a diferença (dados não mostrados). Não havia, portanto, formação de aglomerados dissociáveis.

Após análise em microscópio ótico, notou-se que a diferença entre as técnicas era devida exclusivamente à presença de brotamentos das células. Como as células de *S. cerevisiae* se dividem por brotamento, a células-filha ficam conectadas às células-mãe até atingir desenvolvimento suficiente para se desprender. Nas contagens por câmara de Neubauer, se a célula-filha possui tamanho igual ou superior a 50% do tamanho da célula-mãe, ela é contada como uma segunda célula. Caso seja menor que 50%, ela não é contabilizada. Na contagem por citometria, por sua vez, independentemente do tamanho da célula-filha, ela nunca será contada como um evento extra (Figura 6).

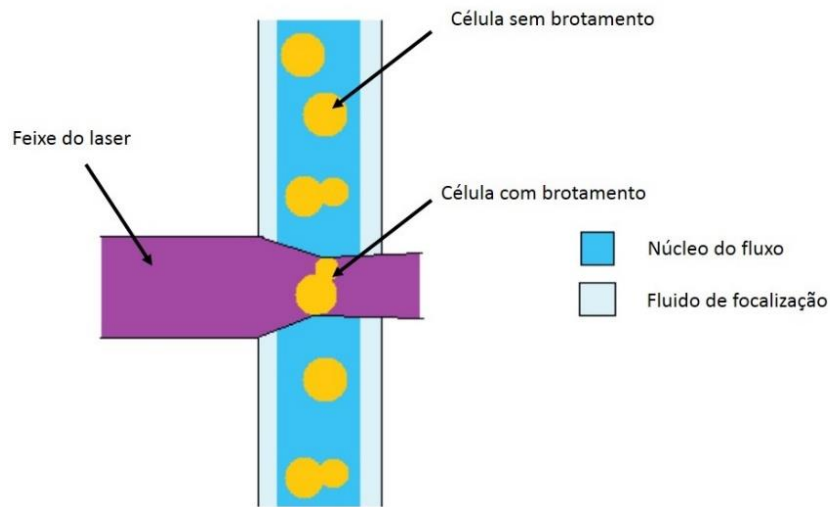


Figura 6. Representação de células de levedura passando pelo ponto de interrogação do citômetro de fluxo. Ponto onde o laser incide sobre a amostra que é transportada pelo sistema fluídico. As células com brotamento são lidas como um único evento, independentemente do tamanho da célula-filha.

Uma solução para realizar a leitura de forma precisa, seria utilizar os dados de largura dos pulsos óticos providos pelo equipamento. Quando a partícula passa pelo feixe do laser, os dados de espalhamento de luz criado são captados pelos detectores do sistema ótico e convertidos em pulsos de voltagem pelo sistema eletrônico do equipamento. Quando a partícula está no centro do feixe do laser, onde o máximo de dispersão de luz é alcançado, obtém-se o ponto mais alto do pulso. O pulso retorna para a linha de base quando a partícula deixa o feixe de laser (Figura 7). Os dados de altura do pico, largura e área de cada evento são gravados.

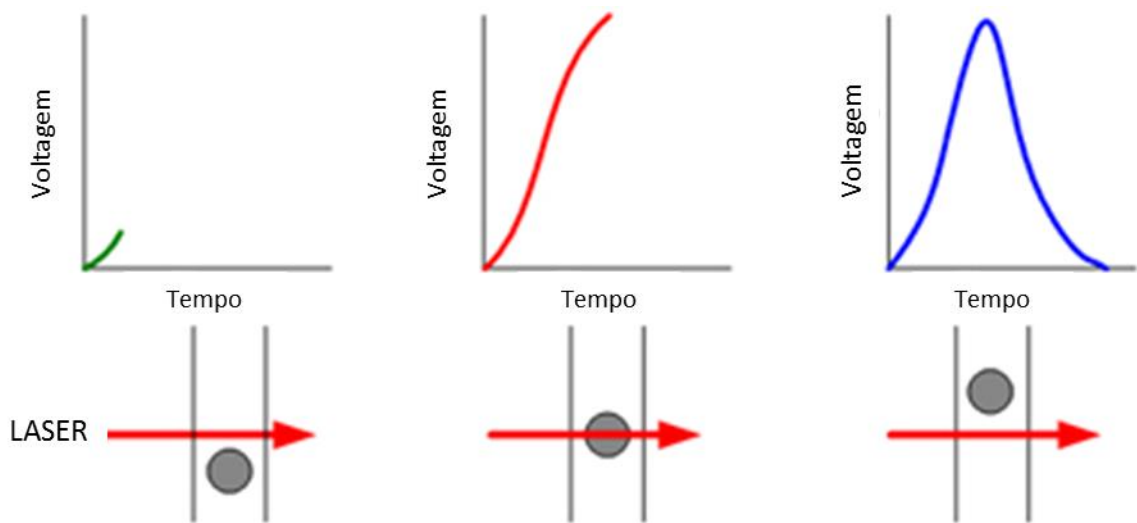


Figura 7. Representação do pulso de voltagem criado quando o evento lido pelo citômetro passa pelo feixe do laser. Adaptado de Flow Cytometry – Applied cytometry, disponível em http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php.

Os dados de largura contêm informações sobre o tamanho da partícula, pois quanto maior a célula, maior o tempo de exposição ao laser e consequentemente, maior a largura do pico de voltagem. Desse modo, células com brotamentos geram picos mais largos de voltagem, enquanto células sem brotamento geraria picos mais estreitos. Ao criar gráficos dotplots relacionando os dados de largura com os dados da área dos picos, o resultado esperado seria uma dupla distribuição dos eventos (Figura 8). Uma população de menor largura representaria células únicas e outra com maior largura representaria células com brotamento.

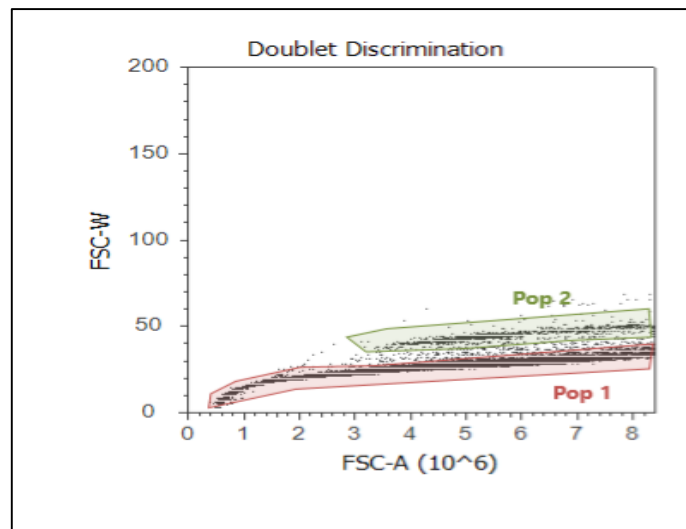


Figura 8. Exemplo de dotplot com distribuição em duas populações de larguras diferentes. Cortesia de Claudia Pantaleão (Life Technologies).

Foram criados gráficos dotplots com as células de leveduras relacionando largura e área dos picos, mas o padrão duplo de distribuição não foi encontrado (Figura 8). Isso porque os brotamentos não são todos do mesmo tamanho, eles estão em diferentes fases de crescimento, desse modo, numa cultura há desde brotamentos pequenos a brotamentos com tamanho semelhante ao da célula mãe. Isso criou um gráfico com padrão de arraste (Figura 9).

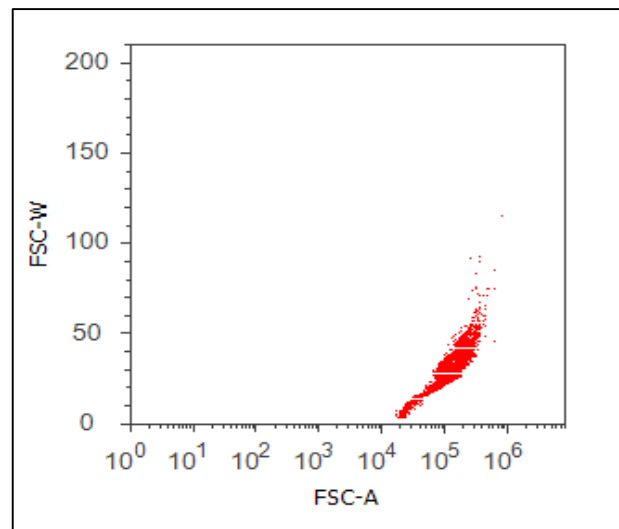


Figura 9. Dotplot correlacionando dados da área (FSC-A) e largura (FSC-W) dos picos resultantes da leitura do tamanho celular. Cada ponto representa um único evento. Não foi encontrado um padrão de distribuição duplo de largura dos picos.

Howard Shapiro (Cytometry Laboratory - West Newton, Massachusetts – EUA, comunicação pessoal) afirma que equipamentos que utilizam dados óticos de espalhamento de luz são menos acurados do que os providos com sistema *Coulter* de contagem. O princípio *Coulter* utiliza um princípio elétrico análogo ao princípio de Arquimedes, em que a célula, um condutor pobre de eletricidade, ao passar por um orifício desloca um volume igual de solução salina, a qual é um melhor condutor. O aumento da impedância elétrica é proporcional ao volume da célula. O equipamento utilizado neste trabalho baseia-se em dados óticos, o tamanho das células é determinado pelo ângulo de dispersão da luz, após essa ser incidida à célula. Foi sugerido, então, correlacionar os dados de tamanho celular com medidas de fluorescência que deem pistas sobre a presença dos brotamentos (Gerhard Nebe-von-Caron, Alere International – Universidade de Cranfield - UK, comunicação pessoal).

A primeira tentativa foi feita com o corante SYTO 9, que se liga ao material genético das células. Células com brotamentos apresentam maior quantidade de DNA, além de produzirem maior quantidade de RNA mensageiro. Os resultados, entretanto, não foram conclusivos (Figura 10). De acordo com Shapiro (comunicação pessoal), também não há uma lacuna na distribuição de DNA, mas a quantificação do

conteúdo de DNA poderia dar uma indicação muito menos arbitrária sobre quanto uma célula progrediu ao longo do ciclo.

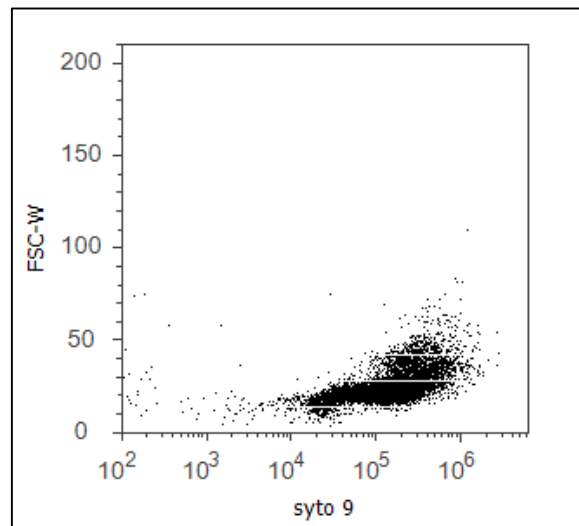


Figura 10. Dotplot correlacionando dados de largura dos picos relativos ao tamanho celular (FSC-W) com os dados de fluorescência (SYTO 9). O SYTO 9 cora material genético. Cada ponto representa um único evento. Não foi encontrado um padrão de distribuição duplo de largura dos picos nem coloração diferencial por SYTO 9.

A segunda tentativa foi feita utilizando o corante Alexa fluor 488 conjugado à Concanavalina A da Invitrogen (Molecular Probes - Eugene, OR, EUA), uma lectina que se liga aos resíduos de manose e glicose presentes na parede celular de *S. cerevisiae*. Esperava-se que com a presença do brotamento, e com o consequente aumento da área de superfície da parede celular, fosse possível obter um padrão duplo de coloração. Haveria, assim, células com maior intensidade de fluorescência causada pela presença do brotamento - o que levaria a um aumento dos resíduos de manose e glicose - e células com menor intensidade de fluorescência causada pela ausência do brotamento. Todavia, mais uma vez o padrão contínuo de aumento de fluorescência foi encontrado (Figura 11), novamente devido à presença de brotamentos de tamanhos diversos.

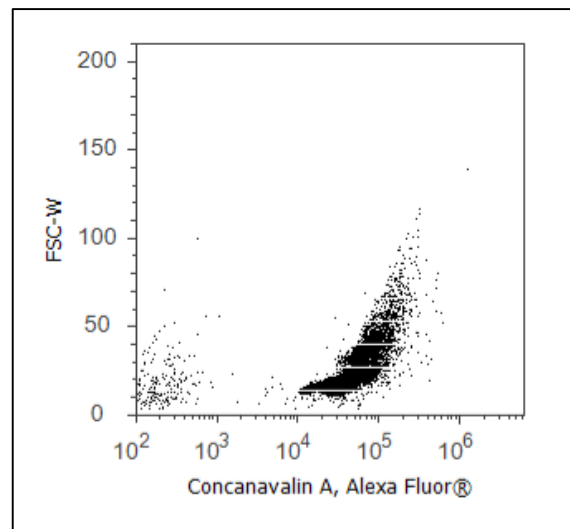


Figura 11. Dotplot correlacionando dados de largura dos picos relativos ao tamanho celular (FSC-W) com os dados de fluorescência (Concanavalina A conjugada à Alexa Fluor® 488). A Concanavalina A se liga aos resíduos de manose e glicose presentes na parede celular e o Alexa fluor é o fluoróforo conjugado para possibilitar a detecção dessa ligação. Cada ponto representa um único evento. Não foi encontrado um padrão de distribuição duplo de largura dos picos nem coloração diferencial.

Apesar de um custo mais elevado frente a outras técnicas, a contagem de células por citometria de fluxo poderia se consolidar como uma técnica ideal, por despende baixos volumes de amostra e por ser mais rápida desde o preparo da amostra à leitura e repetição, caso necessária. Durante experimentos realizados no próprio citômetro de fluxo, poder-se-ia concomitantemente à leitura dos dados de fluorescência, realizar a contagem, sem que fosse necessária a utilização de outros equipamentos. Entretanto, apesar de possibilitar uma quantificação relativa não foi possível obter, através do equipamento de leitura óptica, uma contagem absoluta de células de *S. cerevisiae* estatisticamente igual à obtida pela Câmara de Neubauer, devido à presença dos brotamentos. Estimar a proporção de células com e células sem brotamento é possível através da fixação, tratamento com RNase e posterior coloração com Iodeto de Propídio, como nas técnicas de análise do ciclo celular (SHAPIRO, 2003), mas assim perder-se-ia as vantagens fundamentais da técnica aplicada à contagem, como a praticidade e rapidez da análise.

4.2 Viabilidade celular por citometria de fluxo

No curso de qualquer bioprocessamento, além da determinação da contagem celular, é de extrema necessidade estimar a viabilidade das células presentes no sistema. Considerando as células vivas como células que além de capazes de se reproduzir, sejam células metabolicamente ativas, determinar o seu número possibilita estimar o rendimento do processo. Em pesquisas sobre os efeitos do estresse aos organismos, o cálculo da viabilidade celular permite estimar a intensidade dos danos causados. Em processos industriais, como processos fermentativos, estimar a viabilidade das células possibilita a execução de mudanças no controle do processo, permitindo aumentar a produtividade.

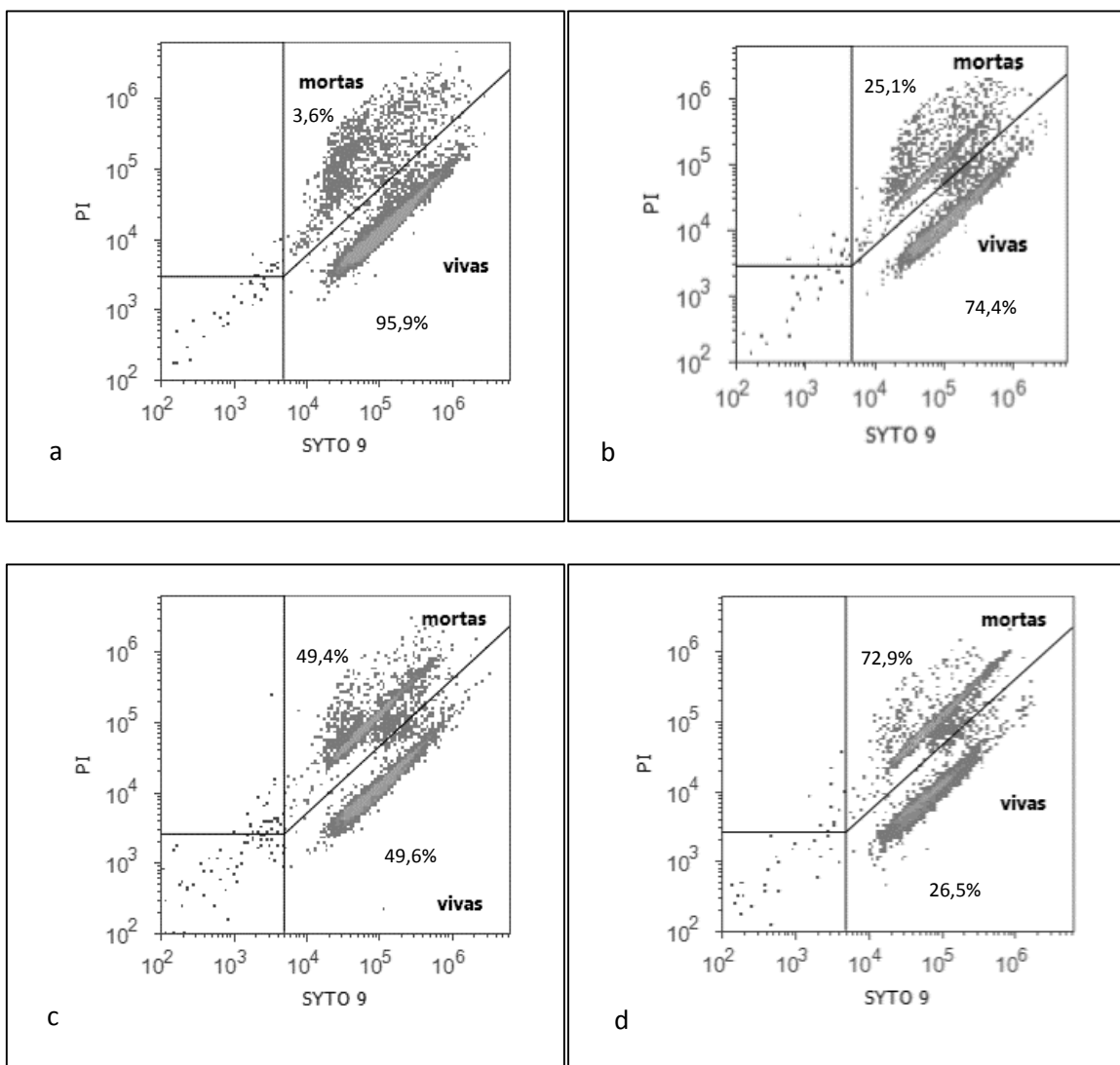
Entre as medidas de análise de viabilidade celular, a mais difundida é a técnica de plaqueamento. Considerada como “padrão-ouro”, essa técnica apresenta diversas desvantagens. Dentre elas a demora para obter os resultados (cerca de 48 horas de incubação) e resultados discrepantes com a realidade, caso as condições do processo sejam muito distintas das condições de cultivo. Além disso, as diluições feitas antes do plaqueamento são feitas com base numa estimativa da quantidade de células presentes. Caso o operador erre a diluição, apenas 48 horas depois ele detectará que perdeu a ponto da análise (DÍAZ *et al.*, 2010).

A citometria por sua vez provê um resultado rápido, mostra a viabilidade celular do momento exato da análise e permite releituras imediatas e mudanças rápidas no processo. Essas características tornam a citometria de fluxo a metodologia ideal para avaliação da viabilidade celular.

O kit LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability da Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, EUA) é baseado na permeabilidade da membrana plasmática das leveduras. Tem como constituintes os fluoróforos SYTO 9 e Iodeto de Propídio (PI). O SYTO 9 (Exc./Em. 480/500 nm) é um fluoróforo que cora o material genético das leveduras, tanto células vivas quanto mortas são permeáveis a tal corante. O Iodeto de Propídio (Exc./Em. 490/635 nm), por sua vez, é um corante que penetra apenas em células estressadas as quais apresentem membrana permeabilizada.

O kit foi previamente testado corando diluições com porcentagens variadas de células vivas e mortas (0/100%, 25/75%, 50/50%, 75/25%, 100/0%). As células

mortas foram obtidas por incubação em álcool isopropanol 70% por 1 hora. Concomitantemente à leitura por citometria, alíquotas das diluições foram plaqueadas para confirmar a correlação entre as técnicas. A análise por citometria de fluxo utilizando SYTO 9 e PI se mostrou adequada com excelentes resultados (Figura 12). Poucas células não foram coradas e a análise é especialmente rápida por não necessitar da etapa de compensação do equipamento, visto que não há sobreposição dos comprimentos de onda de emissão dos corantes.



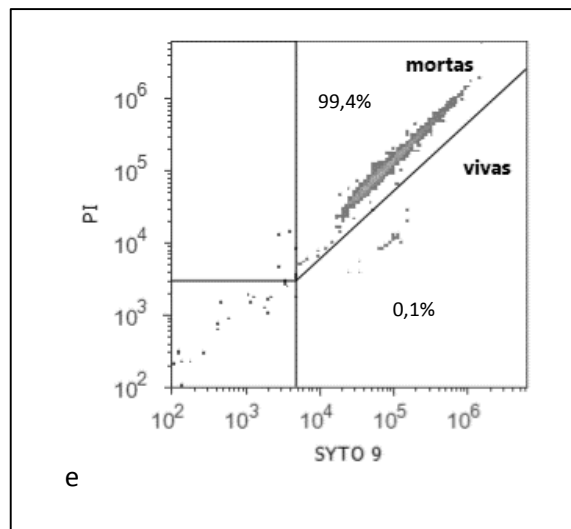


Figura 12. Density plots representando a viabilidade celular de suspensões celulares de leveduras. Eventos no quadrante superior da direita referem-se a eventos que coraram com SYTO 9 e com PI, portanto, células mortas. Eventos no quadrante inferior da direita referem-se a eventos que coraram apenas com SYTO 9, células vivas. Os eventos presentes fora dos dois quadrantes foram considerados eventos não corados. Eventos fora desses dois quadrantes foram considerados não corados. (a) amostra com 100% de células vivas. (b) amostra com 75% de células vivas e 25% de células mortas. (c) amostra com 50% de células vivas e 50% de células mortas. (d) amostra com 25% de células vivas e 75% de células mortas. (e) amostra com 100% de células mortas. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados de apenas uma replicata são mostrados. Experimento não compensado.

Os resultados de ambos os testes foram correlacionados com o percentual de células vivas pipetadas na amostra (Figura 13). Tanto a citometria de fluxo quanto o plaqueamento mostraram forte correlação ao volume teórico presente na amostra com valores de r de Pearson de 0,9940 e 0,9944, respectivamente. Os fluoróforos SYTO9 e PI podem, portanto, ser utilizados em detrimento da técnica de plaqueamento, poupando tempo e evitando que o operador perca pontos dos experimentos realizados.

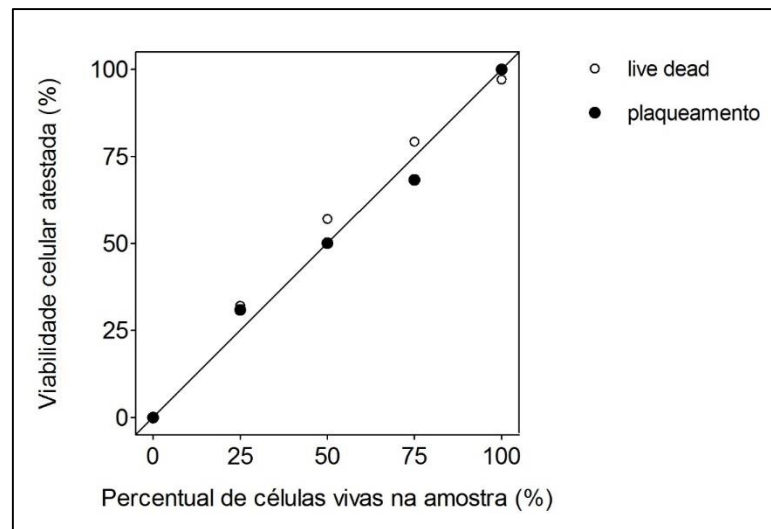


Figura 13. Gráfico de correlação das técnicas de citometria de fluxo por kit LIVE/DEAD® FungaLight™ (representado por círculos abertos) e de plaqueamento (representado por círculos fechados) aos dados de porcentagem teórica de células vivas. Para ambas a técnicas foram observadas correlações positivas. A citometria de fluxo apresentou r de Pearson igual a 0,9940 e a técnica de plaqueamento, r de Pearson igual a 0,9944.

Após a realização dos testes dos fluoróforos, procedeu-se a aplicação da técnica às células de *S. cerevisiae* submetidas a HHP. Células expostas 0,1 MPa (pressão atmosférica) e a 250 MPa, correspondendo a células controle e a células mortas foram coradas com SYTO 9 e PI. Para a amostra sujeita a pressão ambiente ou amostra controle, detectou-se média de 96,3% de células vivas e de 3,7% de células mortas. Para células submetidas à pressão de 250 MPa, foi identificada média de 5,6% de células vivas e de 94,4% de células mortas (Figura 14). Reafirmando o uso dos fluoróforos como indicadores da viabilidade celular.

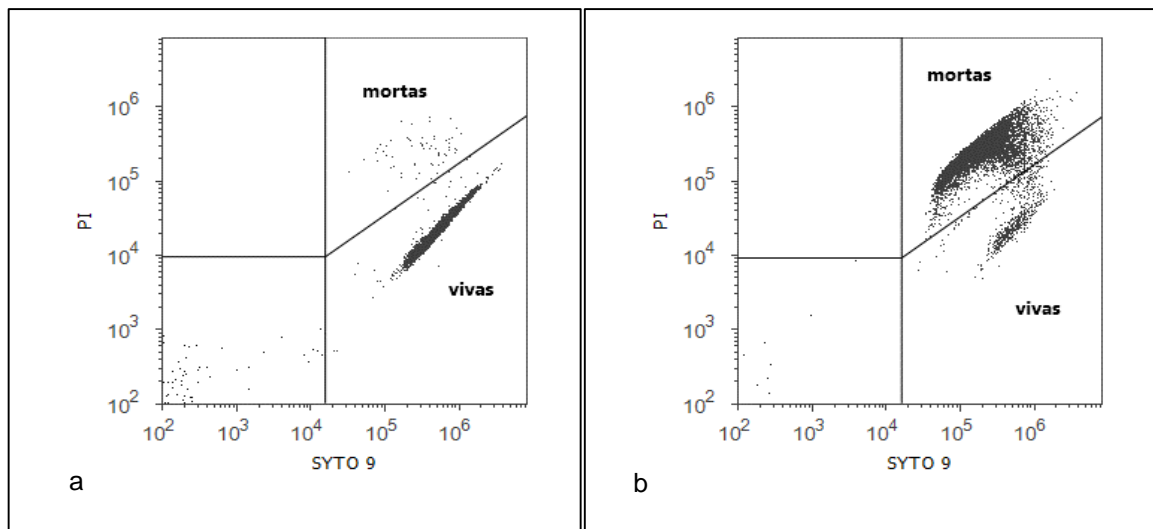


Figura 14. Dot plots representando a viabilidade celular de suspensões *S. cerevisiae* expostas a diferentes valores de pressão. Células expostas a pressão atmosférica ou pressão ambiente (a) e células submetidas ao valor letal de HHP de 250 MPa (b). Eventos no quadrante superior da direita referem-se a eventos que coraram com SYTO 9 e com PI, portanto células mortas. Eventos no quadrante inferior da direita referem-se a eventos que coraram apenas com SYTO 9, células vivas. Os eventos presentes fora dos dois quadrantes foram considerados eventos não corados e portanto, não contabilizados. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados de apenas uma replicata são mostrados. Experimento não compensado.

4.3 Efeito da Alta Pressão Hidrostática na morfologia celular

As análises por citometria de fluxo mostraram que a alta pressão hidrostática provoca uma redução no tamanho celular (Tabela 1 e Figura 15). Os dados de FSC (*forward scatter*) ou tamanho celular relativo das amostras pressurizadas foram comparadas com os dados da amostra controle (à pressão atmosférica, 0,1 MPa). A redução de tamanho em relação ao controle foi observada nos tratamentos de 150 e 200 MPa. Sabe-se que altas pressões hidrostáticas forçam maior empacotamento dos lipídios, o que resulta na redução da fluidez da membrana, gerando uma forma celular mais compacta (FERNANDES *et al.*, 2004). Além disso, sabe-se que o estresse além de interromper o crescimento celular (PALHANO *et al.*, 2004), também reprime diversos genes relacionados à síntese de biomassa. (FERNANDES *et al.*, 2004). A síntese de biomassa permite o aumento do volume celular e a progressão do ciclo celular, por conseguinte, a sua interrupção pode estar relacionada à redução dos dados de tamanho celular relativo.

Os tratamentos de 50 e 100 MPa não causaram reduções celulares estatisticamente significantes (Tukey, $p < 0,05$). Apesar de reconfigurarem as atividades celulares, essas pressões não são suficientes para causar mortalidade nem grandes alterações morfológicas externas nas células de *S. cerevisiae* (SHIMADA *et al.*, 1993). Pressões de 50 e 100 MPa não geram, pois, reduções no tamanho celular.

Tabela 1 - Efeitos da HHP no tamanho e na complexidade celular

Pressão (MPa)	FSC *		SSC **	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
0,1	28344	604	1120	4
50	27074	729	1086	65
100	27637	1385	1013	32
150	23959	353	908	23
200	21252	486	773	127

* FSC : Tamanho celular relativo

** SSC: Complexidade celular relativa

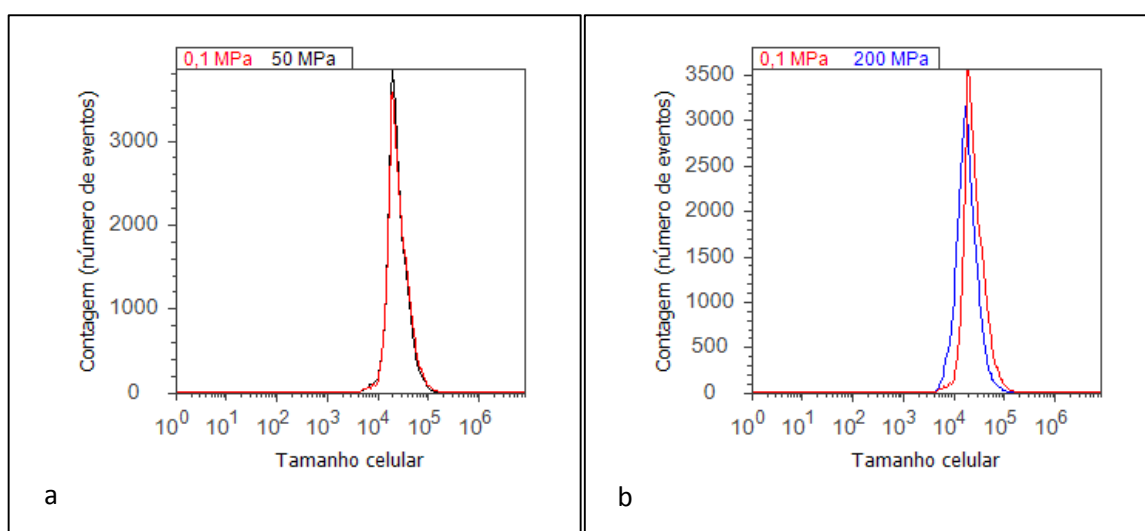


Figura 15. Análises do tamanho celular relativo de células de *S. cerevisiae*, por citometria de fluxo. (a) Picos referentes ao tamanho celular relativo de células em pressão atmosférica, 0,1 MPa - em vermelho - e de células submetidas à 50 MPa - em preto - representadas em um só histograma. (b) Picos referentes ao tamanho celular relativo de células em pressão atmosférica, 0,1 MPa - em vermelho - e de células submetidas à 200 MPa - em azul - representadas em um só histograma. As

pressões 0,1, 50, 100, 150 e 200 MPa foram analisadas em triplicata, apenas 0,1, 50 e 200 MPa foram representadas.

A complexidade celular (*Side scatter* - SSC) também foi reduzida com o aumento da pressão (Tabela 1 e Figura 16). Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas em células submetidas à pressão de 200 MPa. A superfície exterior das células selvagens não é muito alterada por pressões de até 200 MPa, mas o interior das células sofre grandes modificações, como evidências de dissolução da membrana nuclear, alterações no citoesqueleto e na dinâmica das organelas (FERNANDES *et al.*, 2001). De acordo com Shimada *et al.* (1993), a partir de 100 MPa as estruturas internas começam a se degenerar. Portanto, a redução da complexidade celular talvez seja devida à decomposição das estruturas internas, o que reduziria o espalhamento da luz.

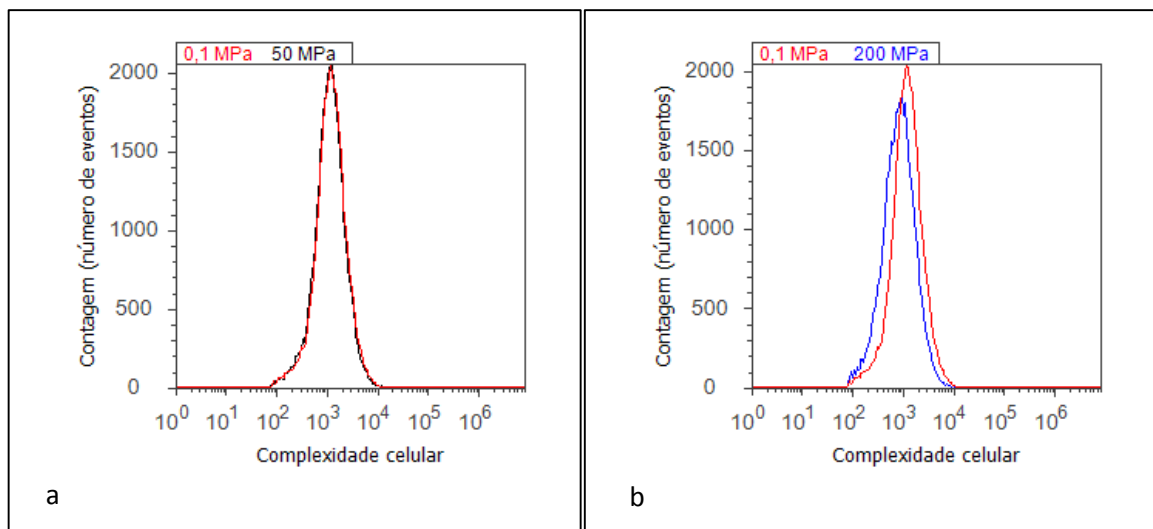


Figura 16. Análises da complexidade celular relativa de células de *S. cerevisiae*, por citometria de fluxo. Picos referentes à complexidade relativa de células à pressão atmosférica, 0,1 MPa - em vermelho - e de células submetidas à 50 MPa - em preto - representadas em um só histograma(a). Picos referentes ao tamanho celular relativo de células em pressão atmosférica, 0,1 MPa - em vermelho - e de células submetidas à 200 MPa - em azul - representadas em um só histograma. As pressões 0,1, 50, 100, 150 e 200 MPa foram analisadas em triplicata, apenas 0,1, 50 e 200 MPa foram representadas(b).

Vários trabalhos têm demonstrado que a HHP induz a repressão de genes relacionados a progressão do ciclo celular e biossíntese de ribossomos e proteínas

de leveduras (PALHANO *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2004; GEORGE *et al.*, 2007; IWAHASHI *et al.*, 2005). Portanto a HHP inibiu a síntese de biomassa e consequentemente levou à diminuição do volume celular. Entretanto, Iwahashi e colaboradores (2005) demonstraram que células de *S. cerevisiae* expostas a pressões hidrostáticas não-letais de 30 MPa apresentaram um aumento no tamanho e na complexidade celular, o que foi justificado pelas alterações sofridas pela membrana celular. Neste trabalho, foi identificada a ativação de uma série de genes relacionados à regulação estrutural da membrana. Considerando que a membrana citoplasmática é uma das primeiras e mais afetadas estruturas celulares pela HHP, os autores concluíram que, a pressões não-letais, as leveduras conteriam os efeitos do estresse à membrana, ativando a biossíntese de seus componentes - gerando um aumento no tamanho e na complexidade celular.

Depreende-se assim, que expostas à HHP, as células passam por diferentes fases conforme o aumento da pressão aplicada. Inicialmente, ao serem submetidas a baixos valores de pressão hidrostática, ocorrem alterações celulares no sentido de superar os efeitos da HHP, principalmente os sofridos pela membrana citoplasmática. As células expostas a pressões não letais (30 MPa) ativam sua maquinaria traducional, biossintetizando componentes estruturais e de defesa, especialmente os relacionados à membrana citoplasmática, um dos alvos mais afetados pela HHP. Essa combinação converge no aumento do tamanho e na complexidade celular (IWAHASHI *et al.*, 2005). Aumentando os valores de pressão hidrostática aplicados (50-100 MPa), os danos causados são tais que a célula já não responde como antes, mantendo então, o tamanho e complexidade celular. A HHP causa redução do volume celular, pois os lipídios da membrana citoplasmática são mais fortemente empacotados, além de reprimir a síntese de diversos genes relacionados à síntese de biomassa. Quando a pressão aplicada alcança altos valores (150-200 MPa), a levedura adquire uma forma celular mais compacta, ocorre o comprometimento da membrana celular e a degradação de diversas estruturas internas, incluindo o citoesqueleto.

4.4 Efeitos da HHP na membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*

O experimento a seguir foi realizado no intuito de conhecer melhor os efeitos da HHP à membrana citoplasmática e conseqüentemente à fisiologia celular de *S. cerevisiae*. Os efeitos da HHP à viabilidade celular já são conhecidos, o interesse era conhecer os estágios intermediários das células estressadas. Os corantes escolhidos para possibilitar essa investigação foram o Bis-Oxonol (BOX), o Brometo de Etídio (BE) e o Iodeto de Propídio (PI).

A análise da fisiologia celular permite detectar a atividade metabólica das células. Células em que sofreram injúria, dormentes, estressadas por inanição podem ter suas funções metabólicas desaceleradas a níveis indetectáveis. As bombas de extrusão são poderosos indicadores do funcionamento do metabolismo celular. O Brometo de Etídio (BE) foi utilizado como indicador do funcionamento das bombas de extrusão. O BE atravessa membranas citoplasmáticas intactas, se liga ao DNA, mas é ativamente bombeado para fora das células saudáveis por meio do sistema de transporte próton/ antiporte não específico. As células estressadas com sistema de extrusão afetado, por sua vez, não conseguem expulsar o BE para o ambiente e permanecem, portanto, corados com o fluoróforo.

O potencial de membrana é um dos parâmetros mais utilizados para determinar o estado da fisiologia celular, sendo considerado uma medida da saúde dos microrganismos. O gradiente de potencial elétrico transmembranar em microrganismos varia entre 100 e 200 mV, com o interior negativo e gera uma permeabilidade seletiva e possibilita o transporte ativo de íons através da membrana plasmática. O potencial de membrana é gerado devido ao diferente teor de íons no interior e fora da célula e isso está relacionado à síntese de ATP, em conjunto com o transporte de solutos, e homeostase do pH interno. Medições do potencial de membrana são geralmente realizadas com corantes lipofílicos que conseguem passar pela membrana celular e acumular no interior da célula de acordo com a sua carga. Se a força próton-motriz não existir, a célula geralmente não mostra a intensidade de fluorescência. O corante Bis - (ácido 1-3 dibutilbarbitúrico) trimethine oxonol ou Bis-Oxonol é um fluoróforo lipofílico e aniônico e acumula intracelularmente quando a membrana citoplasmática está despolarizada. A atividade metabólica e o crescimento celular dependem de uma membrana

citoplasmática intacta que separa a célula de seu ambiente. Células sem membrana intacta não são capazes de manter ou gerar gradiente eletroquímico que cria o potencial de membrana. Sem o potencial de membrana, as estruturas celulares internas são livremente expostas ao ambiente, essa perda da permeabilidade pode levar à degradação da célula. A avaliação da integridade da membrana é a prova mais próxima da viabilidade celular real. O Iodeto de Propídio (PI) detecta a perda da barreira de permeabilidade da membrana, sendo capaz de penetrar apenas as células com membranas permeabilizadas, se ligando ao material genético de células permeáveis, consideradas mortas (DÍAZ *et al.*, 2010).

Os corantes BE, BOX e PI estão relacionados a medidas dependentes de energia da membrana, caracterizando se os sistemas de exclusão de corantes estão ativos, se a membrana citoplasmática está polarizada e se está permeabilizada. Apesar de não obedecerem obrigatoriamente a esta ordem, as células seguem uma progressão de efeitos do estresse em suas membranas (Figura 17). Pois ao sofrerem estresse as bombas do sistema de transporte da membrana podem parar de trabalhar, consequentemente, a célula perde seu potencial de membrana e em seguida, a membrana se torna permeável. A progressão não é obrigatória pois a perda do potencial de membrana, por exemplo, pode ser causada por outros motivos além da suspensão do funcionamento das bombas. Assim como a permeabilização das membranas pode ser independente da perda do potencial de membrana (NEBE-VON-CARON *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004).

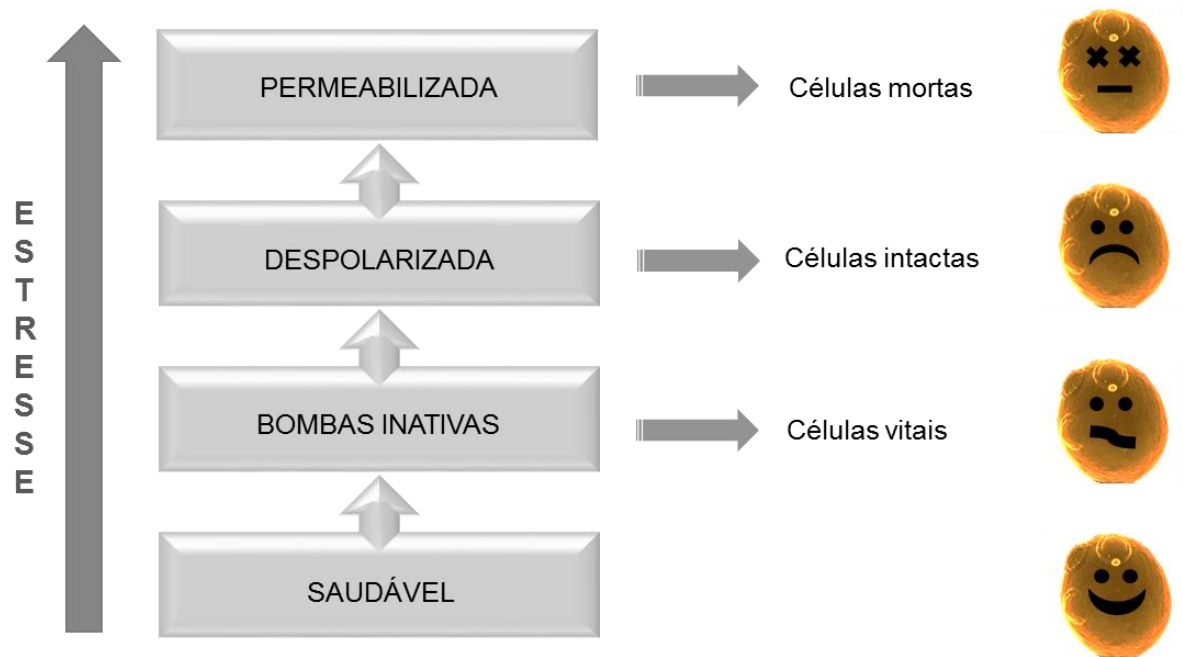


Figura 17. Mudança progressiva do estado fisiológico da membrana citoplasmática frente ao estresse. Conforme a exposição ao estresse, a célula antes saudável perde a atividade do sistema de bombas (células vitais), sofre despolarização de sua membrana (células intactas) e tem sua membrana despolarizada (células mortas). Baseado em NEBE-VON-CARON *et al* (2000).

Os primeiros experimentos, apesar de compensados tiveram suas amostras coradas separadamente com cada fluoróforo. Os resultados mostraram que o aumento da pressão causou um aumento do número de células com sistema de transporte por bombas inativo (Figura 18). Os resultados foram estatisticamente significativos quando as células foram submetidas a pressões de 150 e 200 MPa - pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

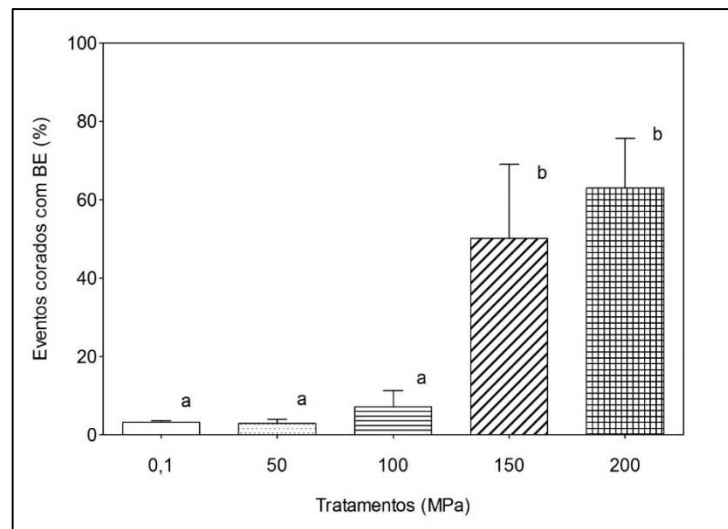


Figura 18. Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP ao sistema de transporte por bombas da membrana. No eixo x, os valores de HHP aplicados às amostras. No eixo y, a porcentagem de células coradas com o Brometo de Etídio, fluoróforo que detecta o dano. As análises foram feitas em triplicatas. As barras em cada coluna referem-se ao desvio padrão. Letras iguais referem-se a médias iguais estatisticamente (Tukey, $p < 0.05$).

O aumento da pressão também aumentou a despolarização das membranas (Figura 19). As pressões de 150 e 200 MPa causaram maior despolarização das células quando comparadas às células submetidas à pressão ambiente, 50 e 100 MPa.

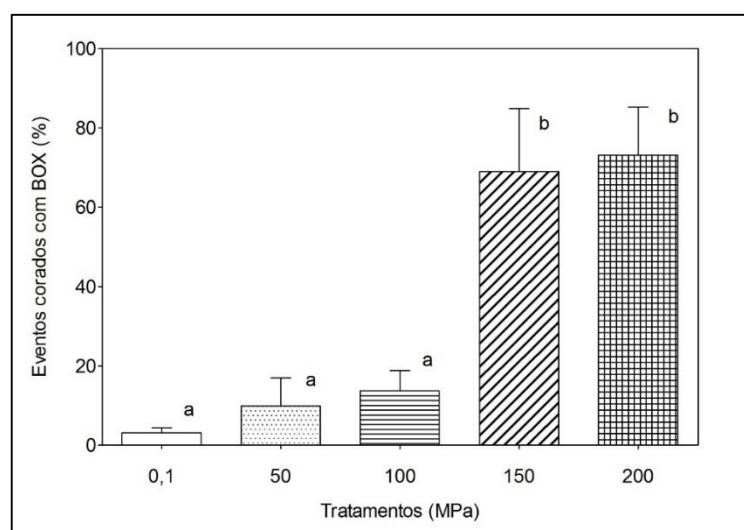


Figura 19. Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP à polarização da membrana. No eixo x, os valores de HHP aplicados às amostras. No eixo y, a porcentagem de células coradas com o Bis-Oxonol, fluoróforo que detecta o dano. As análises foram feitas em triplicatas. As

barras em cada coluna referem-se ao desvio padrão. Letras iguais referem-se a médias iguais estatisticamente (Tukey, $p < 0.05$).

Pressões de 150 e 200 MPa também aumentaram significativamente a permeabilidade das membranas (Figura 20).

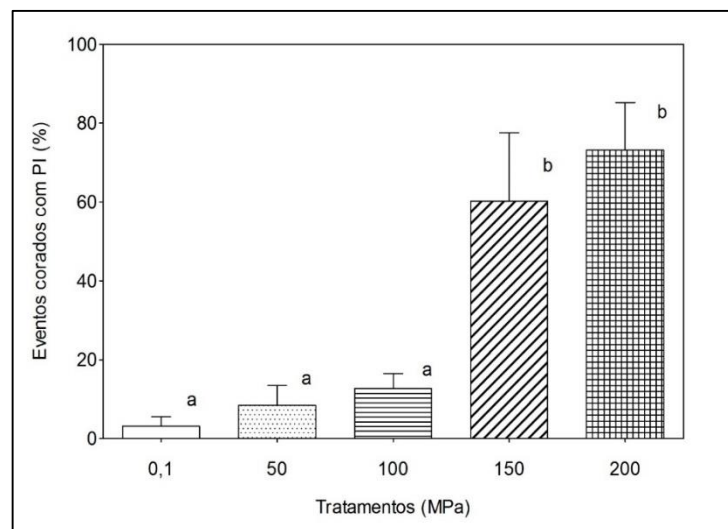


Figura 20. Gráfico de colunas sobre o efeito de diferentes valores de HHP à permeabilidade da membrana. No eixo x, os valores de HHP aplicados às amostras. No eixo y, a porcentagem de células coradas com o Iodeto de Propídio, fluoróforo que detecta o dano. As análises foram feitas em triplicatas. As barras em cada coluna referem-se ao desvio padrão. Letras iguais referem-se a médias iguais estatisticamente (Tukey, $p < 0.05$).

Os resultados mostraram que entre as pressões de 100 MPa e 150 MPa, cria-se um ambiente altamente prejudicial para as membranas de leveduras *S. cerevisiae*. Células submetidas a 50 e a 100 MPa apresentaram padrões de coloração muito semelhantes aos das células a pressão ambiente. 150 e 200 MPa, por sua vez apresentaram um padrão semelhante entre si e bem distintos das três pressões menores (Figura 21).

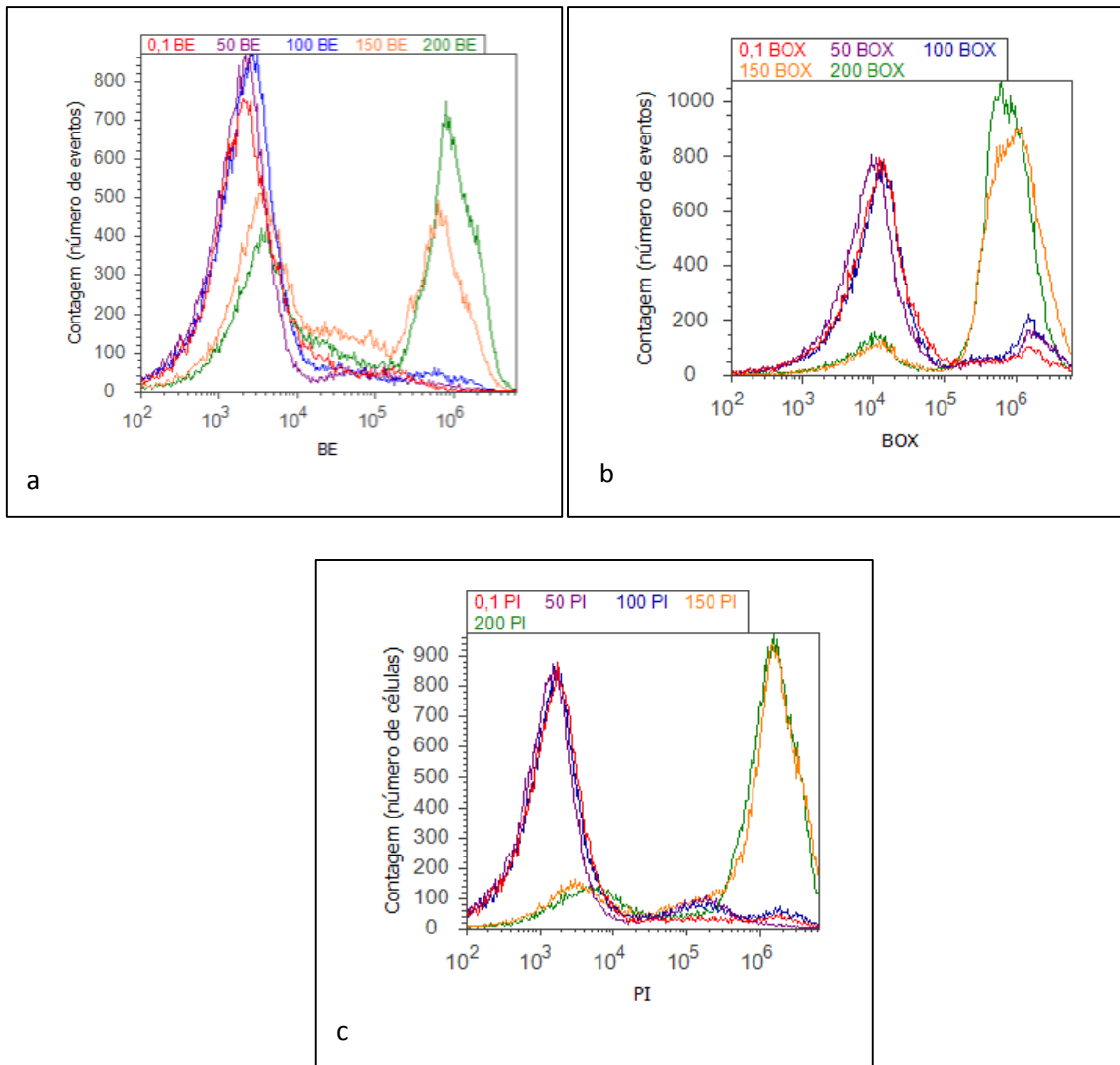


Figura 21. Histogramas relacionando a quantidade de células com suas intensidades de fluorescência emitidas de BE, BOX e PI. Os picos de todas as pressões aplicadas foram unidas num único gráfico. Histogramas referentes às amostras coradas com Brometo de Etídio (a), Bis-oxonol (b) e Iodeto de Propídio (c).

Os resultados acima, apesar de valiosos, não mostram a distribuição das células entre os diversos estados fisiológicos possíveis. Ou seja, ainda não era possível saber se uma determinada célula corada com Bis-oxonol (depolarizadas) estava também corada com Iodeto de Propídio (permeabilizada ou morta), por exemplo. Para que isso fosse possível era necessário criar uma compensação adequada para que a amostra fosse corada com todos fluoróforos juntos.

A interpretação clássica de dotplots, como mostrada na Figura 22, não se aplica a essa análise por terem sido utilizados três corantes e pelas particularidades da forma como cada um dos fluoróforos utilizados se liga à amostra. Criando gráficos correlacionando o comprimento de onda de fluorescência do BOX vs BE, esperava-se observar quatro populações distintas. A região 3 mantém alojando a população não corada por nenhum dos corantes, no caso, células vivas saudáveis. A região 4, também mantém alojando as células coradas apenas com o corante do eixo x, no caso, coradas com BE. A região 2 continua também mantendo as populações coradas com corantes do eixo x e do eixo y, ou seja, coradas com BE e com BOX. A diferença está no quadrante 1, nele estão presentes as células coradas com BOX, BE e PI (em vez de serem observadas células coradas apenas com BOX, como na interpretação clássica). Isso se dá porque quando o PI consegue entrar na célula, ao se ligar ao material genético ele desloca o BE ligado anteriormente, pois eles competem pelos sítios de ligação. Assim, esse quadrante comporta eventos corados com BOX e PI, que deslocou o BE, que estava anteriormente ligado (Figura 23).

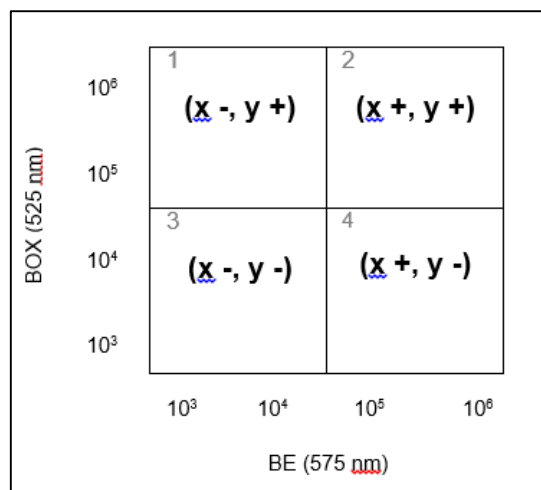


Figura 22. Interpretação clássica de um dotplot. Amostras coradas com apenas dois corantes, sem influência entre si. A população presente no quadrante 3 é negativa para ambos corantes, note que tanto para eixo x quanto o eixo y a intensidade de fluorescência é de aproximadamente 10^3 (região onde é setada a fluorescência do controle negativo não corado em equipamentos digitais). A população presente na região 4 representa as células coradas apenas com o corante do eixo x; no exemplo, positiva apenas para o BE. A região 1, comporta as células coradas apenas com o corante do eixo y, no caso, coradas apenas com BOX. Na região 2, se localizam as células positivas para ambos corantes. Embora a posição e formato do gate possam variar (devido com as características do corante, como a magnitude da fluorescência do corante ou devido da qualidade da compensação, etc.) a disposição das populações segue esse padrão.

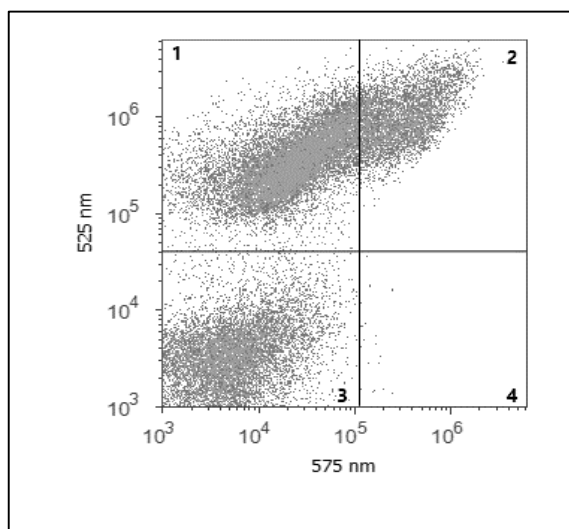


Figura 23. Interpretação de plots de amostras coradas com BE, BOX e PI; A população presente no quadrante 3 é negativa para todos os corantes. A população presente na região 4 representa as células coradas apenas com o BE. Na região 2 se localizam as células positivas para BE e BOX. A região 1, comporta as células coradas todos fluoróforos, BE, BOX e PI.

Os resultados mostraram o aumento da despolarização das células, principalmente entre 0,1 e 50 MPa. Observa-se também aumento substancial de células mortas a partir de 150 MPa (Tabela 2) (Figura 24).

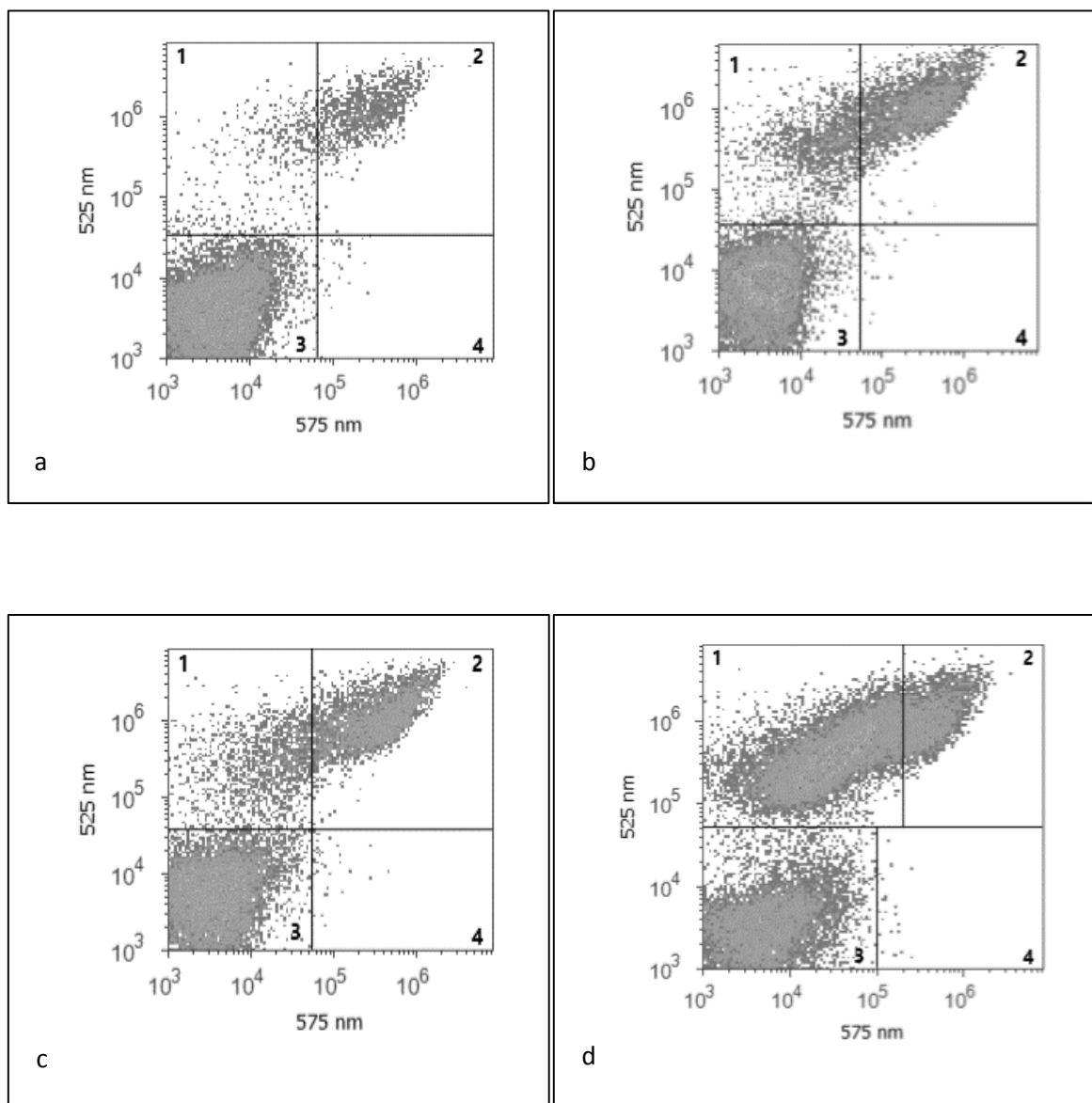
Tabela 2 – Estado fisiológico das células de *S. cerevisiae* frente a diferentes tratamentos de pressão hidrostática.

Pressão (MPa)	Células vivas (%)	Células despolarizadas (%)	Células permeabilizadas (%)
0,1	94,36	3,52	2,07
50	83,99	7,75	7,13
100	81,44	8,64	9,31
150	50,24	11,70	35,43
200	33,87	14,63	50,23

As porcentagens restantes suficientes para completar 100% ficaram localizadas no quadrante BE, mas isso não caracterizou uma população propriamente dita.

Os resultados, entretanto, mostraram apenas três populações. Assim como no trabalho de Hewitt e Nebe-Von-Caron (2001), realizado com bactérias, não foi

detectada uma população corada unicamente com Brometo de Etídio (região 4 da Figura 23, ou seja, não foram encontradas células no estágio inicial do estresse, com deficiência apenas nas bombas do sistema de transporte. Mesmo realizando diversos testes alterando a concentração dos corantes (dados não mostrados), a população não foi detectada. Tal população talvez seria observada caso o tempo de tratamento fosse mais curto ou caso a pressão fosse mais amena. Essa também pode ser uma característica típica do estresse.



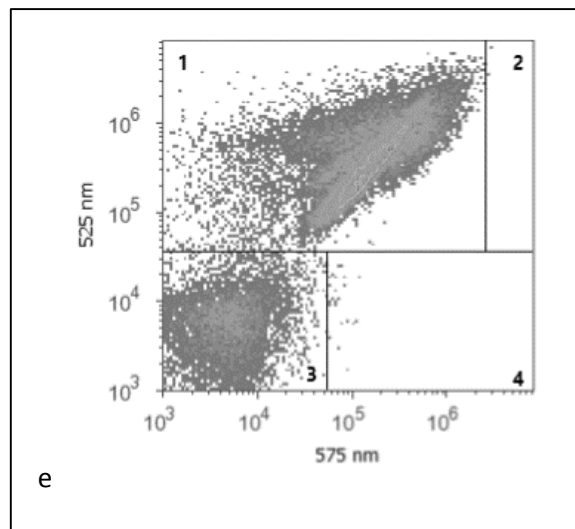


Figura 24. Efeitos da HHP na fisiologia da membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*. As amostras foram coradas com BOX, BE e PI. As amostras foram tratadas com 0,1; 50;100; 150 e 200 MPa (a,b,c,d,e respectivamente). Gate 1 representa células mortas. O gate 2, representa células despolarizadas, coradas com BE e BOX. O gate 3 comporta células saudáveis, não corado com nenhum corante. E o gate 4, comportaria células coradas apenas com BE (a população não foi detectada). Foi necessário mover o gate 1, apenas para os tratamentos de 150 e 200 MPa, para garantir a abrangência de sua população devido ao aumento da fluorescência.

Os resultados mostram aumento significativo de células estressadas com membranas despolarizadas já a 50 MPa. As células despolarizadas não são detectadas por plaqueamento nem pela técnica de viabilidade celular. Hewitt e Nebe-von-caron (2001) afirmam que 20 a 80% das células de bactérias fermentativas com membranas despolarizadas não são cultiváveis por plaqueamento.

Esses resultados mostram a importância de investigar mais profundamente, a fisiologia celular das células, tanto em estudos sobre estresse quanto em processos industriais. Em processos fermentativos industriais, por exemplo, as células de levedura são expostas a uma combinação simultânea ou sequencial de diversos estresses (BRAVIM *et al.*, 2010). Esses estresses podem não ser suficientes para causar a morte celular, mas podem causar danos suficientes para reduzir a fermentação. Sabe-se que uma membrana citoplasmática polarizada e um sistema de transporte ativo são essenciais para uma célula completamente funcional e saudável (HEWITT E NEBE-VON-CARON, 2001). Attfield *et al* (2000) mostraram

que há uma relação razoavelmente forte entre a despolarização da membrana e a redução da atividade de fermentação. Ou seja quanto menos células despolarizadas, maior é a fermentação tornando, portanto fundamental a detecção dentre as células vivas, quantas estão estressadas.

4.5 Comparação entre as técnicas de viabilidade e fisiologia celular

As análises de fisiologia celular mostraram que não houve a detecção de uma população corada apenas por BE, portanto, não foi possível detectar o estágio inicial do estresse no qual as células apresentam falha de funcionamento de suas bombas. Dessa forma, nas análises seguintes, o uso do BE foi suprimido. Nas condições nas quais os experimentos foram realizados, sugere-se o uso apenas do BOX e PI. O próximo passo foi verificar se os resultados das análises de fisiologia celular eram coerentes quando comparados aos resultados da viabilidade celular. Para tal, uma nova análise foi realizada, utilizando o BOX e PI para corar células expostas à pressão ambiente (amostra controle) e células expostas a 100 MPa. E para comprovar a validade e precisão da análise, realizou-se, concomitantemente, a coloração de alíquotas das mesmas amostras com o kit LIVE/DEAD® FungaLight™.

A amostra controle, exposta à pressão ambiente (0,01 MPa) quando corada com SYTO 9 e PI apresentou médias de 97,5% de células vivas e 2,5% de células mortas. Ao serem coradas com BOX e PI, exibiram médias de 93,1% de células vivas saudáveis, 5,1% de células vivas estressadas e 1,8% de células mortas (Figura 25).

As células submetidas à 100 MPa, ao serem coradas com SYTO 9 e PI apresentaram médias de 80,1% de células vivas e 19,9% de células mortas. E quando coradas com BOX e PI, exibiram médias 60,7% de células vivas saudáveis, 14,0% de células vivas estressadas e 25,3% de células mortas (Figura 26).

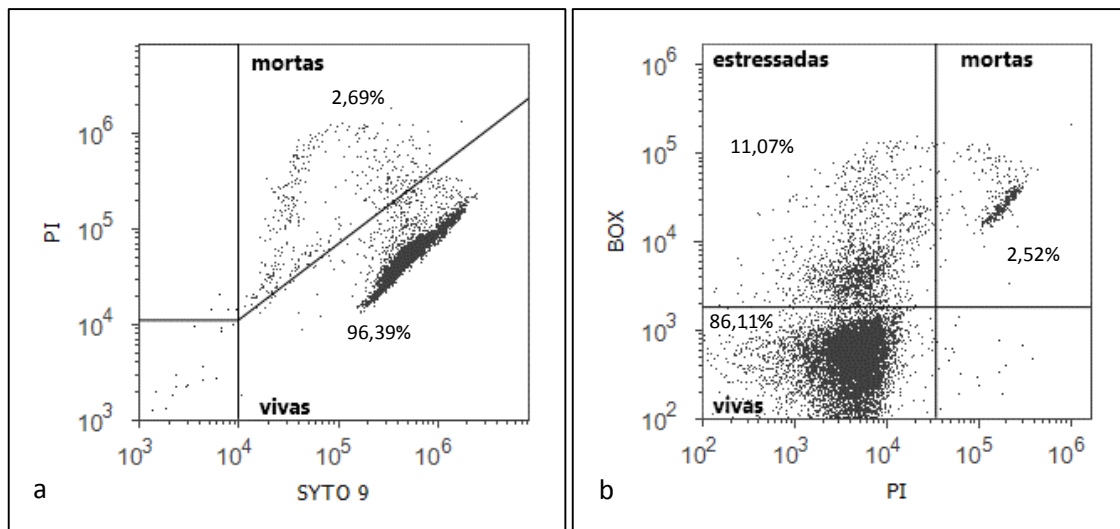


Figura 25. Investigação da viabilidade e fisiologia celular de amostras expostas à pressão atmosférica (0,1 MPa). Resultados divididos em células mortas x células vivas obtidos pelo kit LIVE/DEAD® FungaLight™ - dados não compensados, conforme indicação do fabricante (a). Resultados obtidos pela coloração com BOX e PI, dividindo as células da amostra em células vivas saudáveis x células vivas estressadas x células mortas. Os gráficos são a representação de uma das três replicatas realizadas.

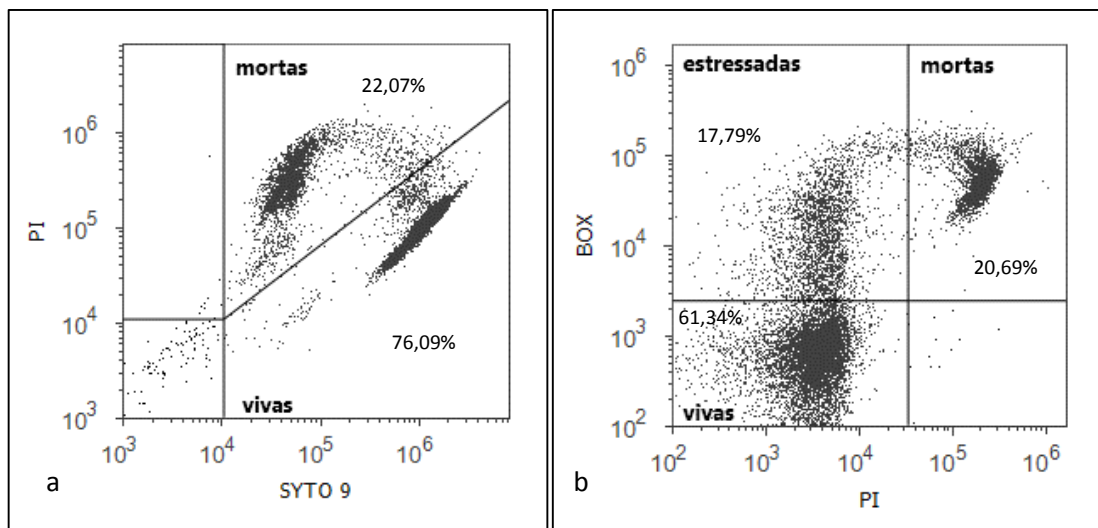


Figura 26. Investigação da viabilidade e fisiologia celular de amostras expostas à 100 MPa. Resultados divididos em células mortas x células vivas obtidos pelo kit LIVE/DEAD® FungaLight™ - dados não compensados, conforme indicação do fabricante (a). Resultados obtidos pela coloração com BOX e PI, dividindo as células da amostra em células vivas saudáveis x células vivas estressadas x células mortas. (b) Os gráficos são a representação de uma das três replicatas realizadas.

Os dados obtidos com a coloração com BOX e PI quando comparados aos da análise de viabilidade celular, mostram-na como uma excelente técnica na detecção dos danos causados pelo estresse por HHP. Observa-se que ambas as técnicas fornecem dados iguais de células mortas, tanto nas amostras controle quanto nas amostras tratadas. O grande diferencial na obtenção dos dados referentes às células vivas; enquanto o kit de viabilidade celular detecta apenas a viabilidade dessas células, a análise de fisiologia celular divide as células vivas em duas subpopulações: vivas/saudáveis e vivas/estressadas. A técnica é muito mais detalhada, indo além da quantificação da viabilidade celular, mostrando dentre as células vivas, quantas estão com a membrana despolarizada e portanto, estressadas. (Figura 27, 28 e 29). Esses dados são de extrema importância em estudos sobre os efeitos do estresse às células e em processos industriais como por exemplo, processos fermentativos, onde sabe-se que há correlação entre o aumento de células despolarizadas com o decréscimo do rendimento total das reações de fermentação (Attfield, 2000).

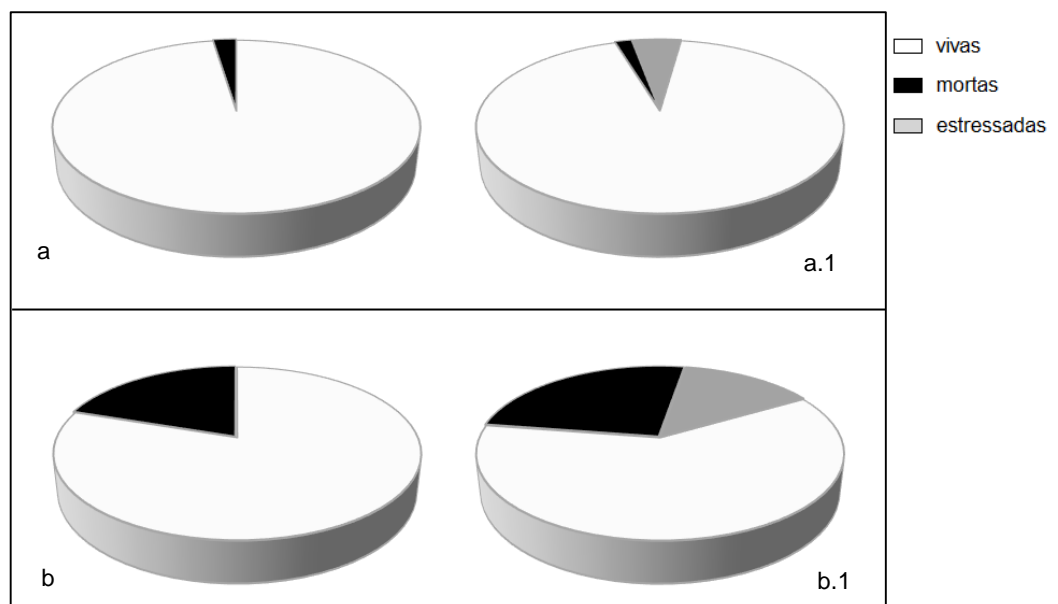


Figura 27. Viabilidade e fisiologia celular de *S. cerevisiae* expostas a 0,1 e 100 MPa. Resultados divididos em células mortas x células vivas obtidos pelo kit LIVE/DEAD® FungaLight™ em amostras expostas a 0,1 MPa (a). Resultados obtidos pela coloração com BOX e PI, dividindo as células expostas a pressão ambiente em células vivas saudáveis x células vivas estressadas x células mortas (a.1). Resultados divididos em células mortas x células vivas obtidos por análise de viabilidade celular em amostras expostas a 100 MPa (b). Resultados obtidos por coloração com BOX e PI, dividindo as

células expostas a 100 MPa em células vivas saudáveis x células vivas estressadas x células mortas (b.1) Os gráficos são a representação da média de triplicatas.

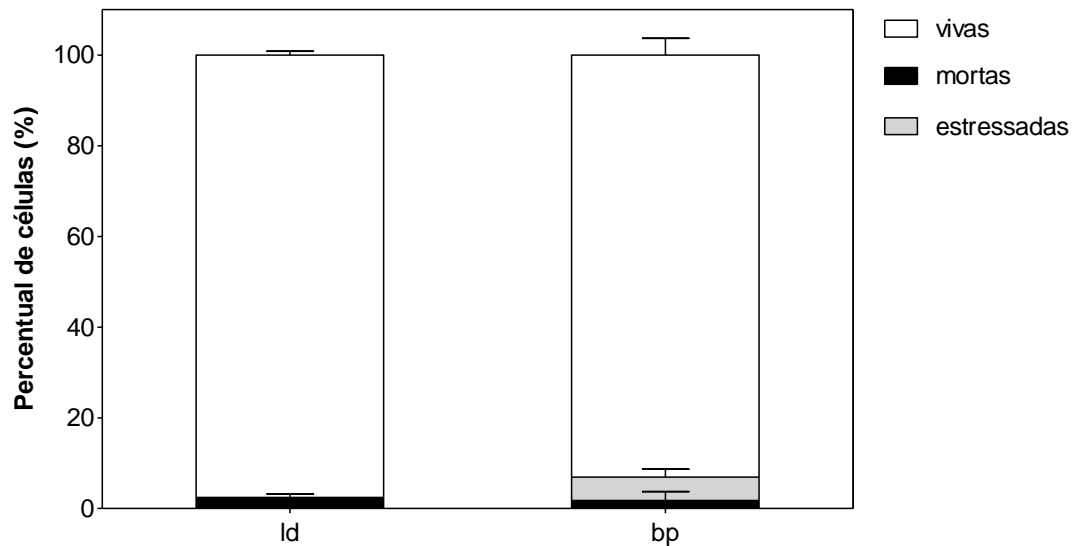


Figura 28. Representação da viabilidade e os estágios fisiológicos de amostras de *S. cerevisiae* expostas à pressão ambiente. Resultados divididos em células mortas x células vivas obtidos pelo kit LIVE/DEAD® FungaLight™ (ld). Resultados obtidos pela coloração com BOX e PI, dividindo as células em células vivas saudáveis x células vivas estressadas x células mortas (bp). Os gráficos são a representação da média de triplicatas, com barras de erro que referem-se ao desvio padrão.

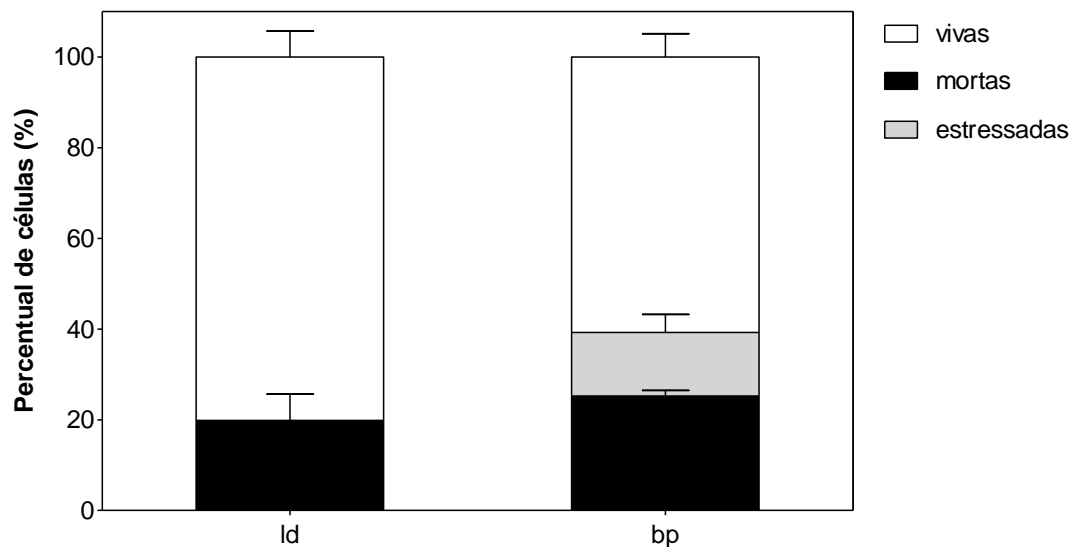


Figura 29. Gráfico de colunas representando a viabilidade e os estágios fisiológicos de amostras de *S. cerevisiae* expostas a 100 MPa. Resultados divididos em células mortas x células vivas obtidos por análise de viabilidade celular - LIVE/DEAD® FungaLight™ Yeast Viability (ld). Resultados obtidos por coloração com BOX e PI, dividindo as células em células vivas saudáveis x células vivas estressadas

x células mortas (bp) Os gráficos são a representação da média de triplicatas, com barras de erro que referem-se ao desvio padrão.

As duas técnicas de análise dos danos causados pela HHP em células de leveduras através da citometria de fluxo estudadas neste trabalho foram comparadas com a técnica tradicional de plaqueamento conforme mostrado na Tabela 3. No quesito facilidade, o plaqueamento se destaca por não ser necessário o treinamento do operador para a utilização de um equipamento sensível como é o citômetro. Apesar disso, a técnica de plaqueamento perde pontos pois o operador deve apresentar boa pipetagem, além de ser capaz de prever os resultados que serão obtidos para realizar a diluição das amostras. A técnica de viabilidade celular feita pela citometria de fluxo, através dos corantes SYTO 9 e PI apresenta boa facilidade por não ser necessária a compensação do equipamento e perde pontos por ser necessário o treinamento do operador para a utilização do equipamento. A técnica de fisiologia celular feita através do uso dos corantes BOX e PI perde pontos em facilidade, por ser necessária ainda a compensação do equipamento.

Quanto a rapidez da reprodução das técnicas, o plaqueamento é muito fraco comparado às técnicas efetuadas no citômetro de fluxo, isso porque os resultados são obtidos apenas após 48 h de incubação das amostras. A técnica de viabilidade celular é muito vantajosa, provendo os resultados em minutos entre as etapas de coloração, incubação e leitura. A técnica de fisiologia celular, por sua vez, perde agilidade por ser necessária a etapa de compensação antes das leituras das amostras.

Quanto aos estágios intermediários de estresse, a técnica de fisiologia celular é a única dentre as três que possibilita a sua detecção. Vencida a etapa de treinamento do operador a manejar o citômetro de fluxo, a técnica de análise da fisiologia celular se sobressai com grande vantagem. A identificação e quantificação dos estágios intermediários dos danos possibilitam uma nova visão dos efeitos de estresses aos organismos, na qual as alterações no funcionamento da maquinaria metabólica fornecem dados valiosos sobre possíveis perdas em processos industriais e a detecção de efeitos não rastreáveis pela simples classificação entre células vivas/ células mortas.

Tabela 3 – Comparação entre as técnicas de análise dos efeitos da HHP utilizadas neste trabalho

TÉCNICA	FACILIDADE	RAPIDEZ	DETECÇÃO DE ESTÁGIOS INTERMEDIÁRIOS DE ESTRESSE
Plaqueamento	++	-	Ø
Viabilidade celular (SYTO 9 e PI)	++	+++	Ø
Fisiologia celular (BOX e PI)	+	++	+

5. CONCLUSÃO

A Citometria de Fluxo pode ser utilizada como uma técnica relativa de contagem de células. Onde se faz necessária a realização de uma curva prévia correlacionando seus resultados aos de uma técnica absoluta, como a contagem por Câmara de Neubauer.

A Citometria de fluxo baseada em dados óticos de espalhamento de luz não se mostrou uma técnica adequada à contagem absoluta do número de células. Os resultados não coincidiram com os resultados obtidos pela técnica tradicional feita através da Câmara de Neubauer. Isso se deu devido à presença de brotamentos junto às células-mãe, que são contabilizados pelo equipamento como um único evento.

Os corantes SYTO 9 e Alexa fluor conjugado à Concanavalina não foram adequados para a discriminar as duas subpopulações formadas por células com e células sem brotamento.

Os fluoróforos SYTO 9 e Iodeto de Propídio se mostraram adequados para a aplicação da análise de viabilidade celular tanto na análise de suspensões controle, mostrando forte correlação com a técnica de plaqueamento, quanto na análise de células de *S. cerevisiae* submetidas à HHP.

A HHP causa uma redução no tamanho celular das leveduras *S. cerevisiae*. As reduções foram observadas ao serem aplicadas as pressões de 150 e 200 MPa. Esses resultados são explicados pelos efeitos conhecidos da HHP às células, como a repressão da síntese de biomassa, maior empacotamento dos lipídios da membrana citoplasmática e interrupção do ciclo celular.

A HHP causa uma redução na complexidade celular de *S. cerevisiae*. As reduções foram observadas ao serem empregadas pressões de 150 e 200 MPa. Os resultados são atribuídos à degradação dos componentes internos das leveduras, gerada pela aplicação de pressões hidrostáticas letais.

A técnica de investigação da fisiologia celular de leveduras utilizando os fluoróforos BE BOX e PI forneceu dados interessantes sobre o estado das leveduras pós

estresse. A partir de 150 MPa, notou-se um aumento significativo dos danos causados pela HHP comparado à pressão atmosférica.

Os resultados mostram um aumento do número de células estressadas a partir de 50 MPa, dados que não são obtidos pelas técnicas de plaqueamento ou pelos fluoróforos SYTO 9 e Iodeto de Propídio. A partir dessa pressão as células se tornam mais despolarizadas que as células expostas à pressão ambiente.

A análise de fisiologia celular, realizada nas condições descritas, não foi capaz de detectar células no estágio inicial de estresse, na qual as bombas citoplasmáticas se tornam inativas, seu uso portanto foi descartado.

A análise de fisiologia celular realizada apenas com os fluoróforos BOX e PI quando comparada aos resultados obtidos com a análise de viabilidade celular mostrou excelentes resultados. Ambas as técnicas forneceram dados iguais de porcentagem de células mortas, tanto nas amostras controle quanto nas amostras tratadas. Quanto às células vivas, enquanto o teste de viabilidade celular detectou apenas a viabilidade das células, a análise de fisiologia celular dividiu os dados referentes as células vivas em duas subpopulações: vivas/saudáveis e vivas/estressadas.

A Citometria de Fluxo se mostrou uma técnica ideal para a avaliação do efeito do estresse em células, além de apresentar leituras rápidas e precisas, a técnica permite combinar diversos corantes possibilitando a análise simultânea de diversas características celulares. No estudo dos danos causados pelo estresse em células, a citometria possibilita a detecção de estágios intermediários de estresse, indo além das análises tradicionais de sobrevivência celular.

6. REFERÊNCIAS

AERTSEN, Abram *et al.* Biotechnology under high pressure: applications and implications. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 434-441, 2009.

ATTFIELD, P. V. *et al.* Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 2, p. 207-214, 2000.

BOYD, A. R. *et al.* A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 1, p. 11-16, 2003.

BRAVIM, Fernanda *et al.* Biotechnological properties of distillery and laboratory yeasts in response to industrial stresses. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 10, p. 1071-1079, 2010.

BRAVIM, Fernanda *et al.* High hydrostatic pressure activates gene expression that leads to ethanol production enhancement in a *Saccharomyces cerevisiae* distillery strain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 2093-2107, 2013.

DEQUIN, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 577-588, 2001.

DÍAZ, M. *et al.* Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. **Biochemical engineering journal**, v. 48, n. 3, p. 385-407, 2010.

ELO, M. A. *et al.* Differential regulation of stress proteins by high hydrostatic pressure, heat shock, and unbalanced calcium homeostasis in chondrocytic cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 79, n. 4, p. 610-619, 2000.

FELDMANN, H. (Ed.). **Yeast: molecular and cell biology**. (2. ed) John Wiley & Sons, 2012 v.1.

FERNANDES, P. *et al.* Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS letters**, v. 556, n. 1, p. 153-160, 2004.

FERNANDES, P. M. B. How does yeast respond to pressure? **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 8, p. 1239-1245, 2005.

FERNANDES, P. M. B. *Saccharomyces cerevisiae* response to high hydrostatic pressure. In: MICHIELS, C.; BARTLETT, D. H., AERTSEN, A (Ed.). **High-pressure microbiology**. Cambridge: American Society for Microbiology. p. 145-166, 2008.

FERNANDES, P. M. B.; FARINA, M.; KURTENBACH, E. Effect of hydrostatic pressure on the morphology and ultrastructure of wild-type and trehalose synthase mutant cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in applied microbiology**, v. 32, n. 1, p. 42-46, 2001.

GEORGE, V. T.; BROOKS, G.; HUMPHREY, T. C. Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 10, p. 4168-4179, 2007.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mechanisms of ageing and development**, v. 120, n. 1, p. 1-22, 2000.

GOFFEAU, A *et al.* Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

HEWITT, C. J.; NEBE-VON-CARON, G. An industrial application of multiparameter flow cytometry: assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. **Cytometry**, v. 44, n. 3, p. 179-187, 2001.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 2, p. 300-372, 2002.

HÜBNER, W.; WONG, P. T. T; MANTSCH, H. H. The effect of hydrostatic pressure on the bilayer structure of phosphatidylcholines containing ω -cyclohexyl fatty acyl chains. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1027, n. 3, p. 229-237, 1990.

IWAHASHI, H. *et al.* Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. **FEBS letters**, v. 579, n. 13, p. 2847-2852, 2005.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeasts. I: ROSE A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.) **The yeasts**. (2. ed) London: Academic Press v. 1, p. 5-61, 1987.

LOPES, M. L. M., MESQUITA, V. L. V., CHIARADIA, A. C. N., FERNANDES, A. A. R., FERNANDES, P. M. B. High Hydrostatic Pressure Processing of

Tropical Fruits: Importance for maintenance of the natural food properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1189, p. 6 - 10, 2010.

MENTRÉ, P.; HOA, G. H. B. Effects of high hydrostatic pressures on living cells: a consequence of the properties of macromolecules and macromolecule-associated water. **International review of cytology**, v. 201, p. 1-84, 2001.

MOLINA-GARCÍA, A. D. The effect of hydrostatic pressure on biological systems. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 19, n. 1, p. 3-54, 2002.

MOTSHWENE, P. *et al.* LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J**, v. 377, p. 769-774, 2004.

MÜLLER, S.; NEBE-VON-CARON, G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 4, p. 554-587, 2010.

NEBE-VON-CARON, G. *et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal of microbiological methods**, v. 42, n. 1, p. 97-114, 2000.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.

PALHANO, F. L.; ORLANDO, M.T. D.; FERNANDES, P. Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology letters**, v. 233, n. 1, p. 139-145, 2004.

PETERS, W. S.; HAGEMANN, W.; DERI TOMOS, A. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in 'soft' plant tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 125, n. 2, p. 151-167, 2000.

RIESEBERG, Marco *et al.* Flow cytometry in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 350-360, 2001.

ROTHSCHILD, Lynn J.; MANCINELLI, Rocco L. Life in extreme environments. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1092-1101, 2001.

SAN MARTIN, M. F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Food processing by high hydrostatic pressure. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 6, p. 627-645, 2002.

SHAPIRO, H. M. **Practical flow cytometry**. (4. ed) John Wiley & Sons, 2003.

SHIMADA, S. *et al.* Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 123-131, 1993.

SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 10, p. 612-618, 2001.

SILVA, T. R. A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. (2004)." Citometria de fluxo-Funcionalidade celular on-line em bioprocessos." **Boletim de Biotecnologia**, v. 77, p. 32-40.

SOMERO, G. N. Adaptations to high hydrostatic pressure. **Annual review of physiology**, v. 54, n. 1, p. 557-577, 1992.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. John Wiley & Sons, 1998.

APÊNDICE 1

Protocolo de contagem e cálculo da concentração celular através da Câmara de Neubauer

A contagem por Câmara de Neubauer (Hemocitômetro ou Câmara de Contagem) é método mais utilizado para a determinação da concentração celular de uma suspensão celular. A Câmara de Neubauer foi projetada para a realização da contagem de células sanguíneas, com o tempo o seu uso foi estendido a outros tipos celulares devido à simplicidade da técnica. O hemocitômetro é um tipo especial de lâmina de microscópio que possui duas câmaras. Cada câmara possui ranhuras entalhadas a laser na sua superfície para delimitar a área e para facilitar a contagem. As marcações subdividem cada câmara em nove quadrados maiores separados entre si por linhas triplas. Cada um desses nove quadrados ou áreas possui área de 1 mm². Devido ao seu tamanho celular, as células de *S. cerevisiae* são adequadamente contabilizadas na área central da lâmina (área C, na Figura 1).

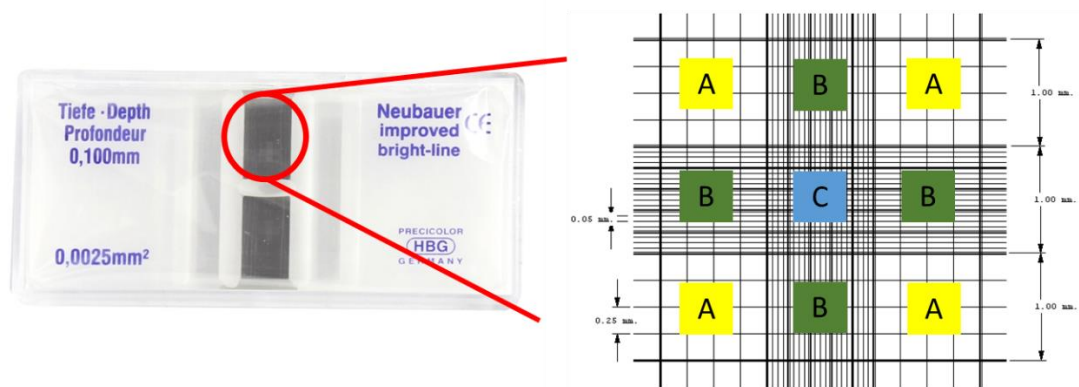


Figura 1: Imagem da lâmina da Câmara de Neubauer. Em destaque, esquema das subdivisões presentes na lâmina, visíveis por microscopia óptica, e que facilitam a contagem. Cada região A, B ou C apresenta área de 1mm² o que possibilita o cálculo da concentração celular final. Fonte: Adaptado de *Como utilizar a Câmara de Neubauer*, disponível em <http://www.protocolosbiomed.com.br/>.

Etapas da contagem:

- 1 - A suspensão celular deve ser homogeneizada.
- 2 - A suspensão deve ser diluída para que haja, preferencialmente, de 50 a 200 células por 1 mm^2 , para uma contagem estatisticamente significativa (Caso durante a contagem, a quantidade de células não esteja entre esse intervalo, a diluição deve ser refeita).
- 3 - A Câmara de Neubauer e sua lamínula apropriada devem ser limpas cuidadosamente com etanol 70% e papel.
- 4 - Após a secagem, a lamínula deve ser colocada sobre a superfície de contagem da Câmara de Neubauer antes da adição da suspensão celular.
- 5 - Com uma micropipeta ou pipeta de Pasteur, pipeta-se verticalmente a amostra próximo à borda da lamínula, permitindo que a amostra preencha a câmara por capilaridade.

O volume pipetado deve ser apenas o suficiente para que a amostra preencha a câmara formada entre o hemocítômetro e sua lamínula (o volume necessário é de aproximadamente $10 \mu\text{L}$).

Todo o processo deve ser refeito caso haja formação de bolhas, caso a amostra pipetada não seja suficiente para preencher a câmara ou caso ocorra transbordamento da suspensão celular (Figura 2).

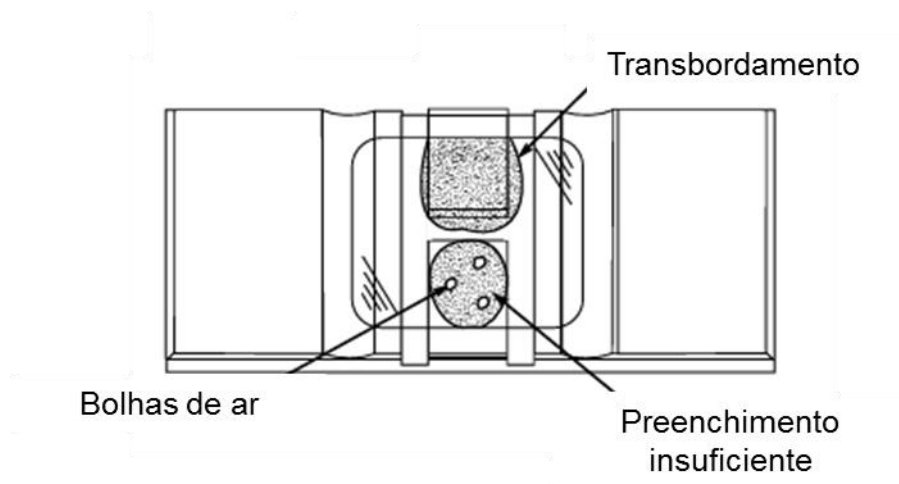


Figura 2: Exemplos de preenchimento incorreto da Câmara de Neubauer. Caso ocorra qualquer um desses eventos: transbordamento, formação de bolhas de ar ou preenchimento insuficiente da câmara, todo o procedimento de preparo da lâmina deve ser refeito. Fonte: Clinical Laboratory – complete blood counting, disponível em <http://ged.free-ed.net/FREE-ed/Resources/PubServ/EMS/EMS%20Primer/emsPrimer01.asp?iNum=704>.

6 - A contagem das células deve ser realizada em um microscópio ótico, com auxílio de uma objetiva de 40x.

É admissível contar apenas as células presentes no campo central e nos quatro campos dos cantos da região C e multiplicar o resultado por 5. Ou ainda contar cinco campos na diagonal (Figura 3).



Figura 3: Representação dos 25 quadrados integrantes da região C. Comumente, as células presentes em todos os 25 quadrados são contadas, mas quando o número de células é elevado, pode-se selecionar 5 quadrados para a realizar a contagem e multiplicar o resultado por 5. Em preto, estão exemplos dos sub áreas que podem ser selecionadas para contagem. Fonte: *Using a*

Hemacytometer for Cell Counts, disponível em http://fg.cns.utexas.edu/fg/protocol%3A_hemacytometer.html.

7 - Todas as células que estejam perfeitamente dentro da área C são contadas. As células fora da área, obviamente, não devem ser contabilizadas.

Atenção especial deve ser dada às células que cubram as quatro arestas limítrofes da área C. Escolha, aleatoriamente, duas arestas perpendiculares da área C e contabilize as células que cubram as arestas escolhidas. As células que estejam sobre as outras duas arestas devem ser desprezadas da contagem (Figura 4).

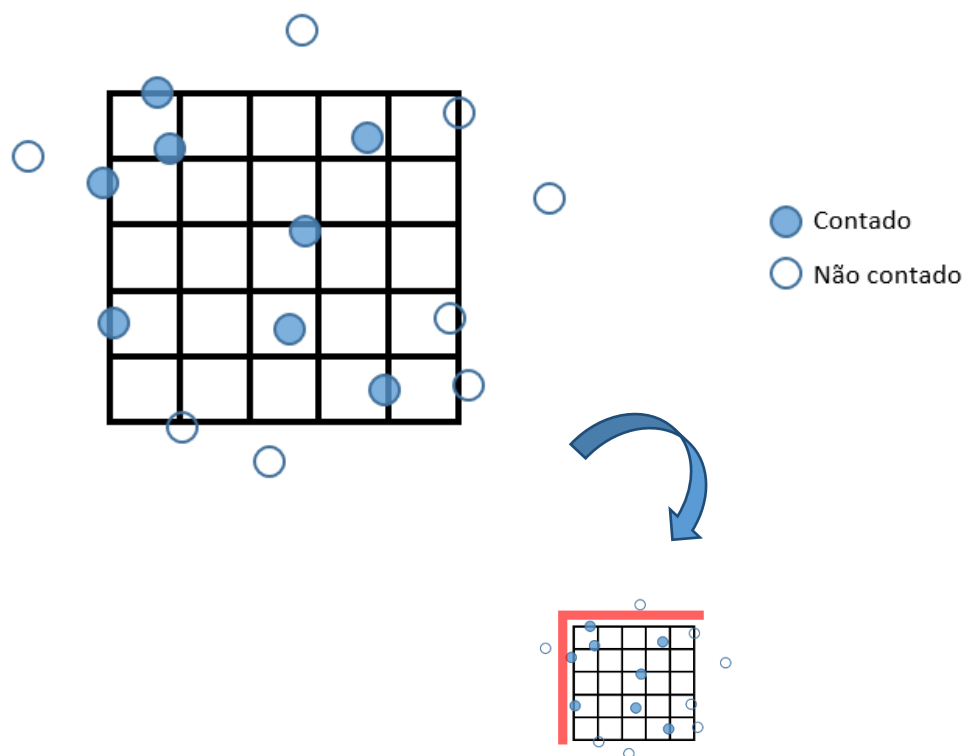


Figura 4: Exemplo de contagem de células. Para contar células que estejam nos limites da área C, sobre a linha que a permeia, contabiliza-se apenas as células sobre duas arestas e desconsidere as outras duas. Nesse exemplo, as arestas escolhidas foram a aresta superior e aresta lateral esquerda, conforme destacado em vermelho na representação de menor escala. Portanto, células que se sobrepuseram a essas arestas foram contabilizadas (círculo fechado), enquanto as células que se sobrepuseram às outras duas, não (círculo aberto).

* Como contar células com brotamento: Células com brotamentos de tamanho igual ou superior a 50% do tamanho da célula-mãe são contabilizadas como 2 células. Quando o brotamento é menor que 50% do tamanho da célula-mãe, ambos são contados como uma célula apenas.

Cálculo da Concentração Celular

A lamínula utilizada sobre a Câmara de Neubauer possui peso adequado para garantir que esteja apoiada a uma altura de 0,1 mm. A área C, portanto, comporta um volume de $0,1 \text{ mm}^3$ ou 10^{-4} cm^3 . Como $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$, pode-se calcular a quantidade de células por mL.

Após a contagem das células, faz-se o cálculo da concentração de células por mL. O cálculo é feito multiplicando o número obtido na contagem pela diluição e pelo fator de correção da Câmara de Neubauer. O fator de correção refere-se à transformação da concentração celular presente no volume de 10^{-4} cm^3 da Câmara de Neubauer para quantidade de células por mL.

Concentração celular = nº de células contabilizadas na Câmara de Neubauer x fator de diluição $\times 10^4$.

APÊNDICE 2

Citometria de Fluxo - Encontrando a população de interesse

Preparo de amostras para leitura no Citômetro de Fluxo

A leitura de amostras por Citometria de fluxo é rápida e prática, entretanto, alguns cuidados devem ser tomados no preparo da amostra. As amostras antes de serem coradas e lidas no citômetro de fluxo devem ser previamente lavadas e ressuspensas em tampão, isso evita que o meio de cultura interfira no processo de coloração e de leitura, além de evitar contaminações no equipamento. Além disso, antes de serem lidas, as amostras devem, SEMPRE, ser diluídas à concentração máxima de 1×10^6 células/mL. Isso evita um fenômeno chamado “Coincidência”, onde dois ou mais eventos passam ao mesmo tempo no ponto de interrogação - região na qual o laser incide sobre a amostra - o que faria com que esses eventos fossem lidos como apenas um evento (Figura 1).

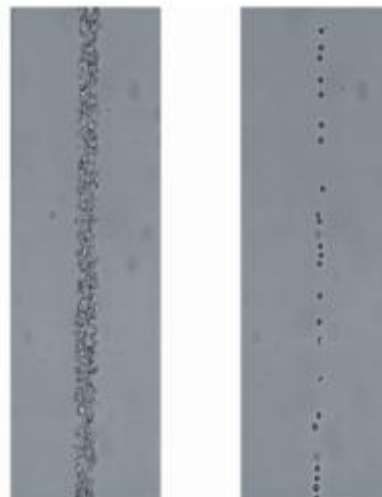


Figura 1: Efeito da diluição das amostras. A diluição das amostras possibilita o alinhamento das partículas ou células num fluxo em linha única e focalizada ao longo de um eixo central, evitando que duas ou mais células passem pelo feixe do laser ao mesmo tempo durante a leitura. À esquerda, fluxo fluídico de uma amostra não diluída e à direita, de uma amostra diluída. Fonte: Attune® Acoustic Focusing Cytometer - User Guide, Life Technologies, disponível em: http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?fullurl=http://tools.lifetechnologies.com:80/content/sfs/manuals/cms_082577.pdf.

Leitura no Citômetro de Fluxo

Gráfico FSC x SSC

O primeiro passo da leitura por citometria é encontrar, dentre numerosos eventos, a sua população de interesse. Ao contrário da leitura em Câmara de Neubauer, onde o usuário seleciona visualmente as células de interesse a serem contabilizadas, o citômetro lê tudo o que está presente na amostra. Isso inclui: as células de interesse, outras células/organismos (caso não se trate de uma amostra de cultura simples ou caso seja uma amostra coletada do meio ambiente), possíveis contaminações e o *debris* (formado por traços de células mortas, resíduos do meio de cultura, sujidades provenientes do equipamento, do tampão de diluição, das vidrarias utilizadas e grumos formados pela má diluição dos corantes).

As células de interesse devem ser selecionadas dentre todos eventos para que as análises seguintes, feitas pelo equipamento, sejam referentes apenas a elas, dessa forma, evitam-se erros de análise. A seleção das células de interesse é feita no primeiro gráfico gerado durante a leitura: o dot plot FSC x SSC. O dot plot é um gráfico de dois eixos, onde cada evento lido é representado por um ponto (Figura 2). Os eventos incluem tudo que o equipamento detecta.

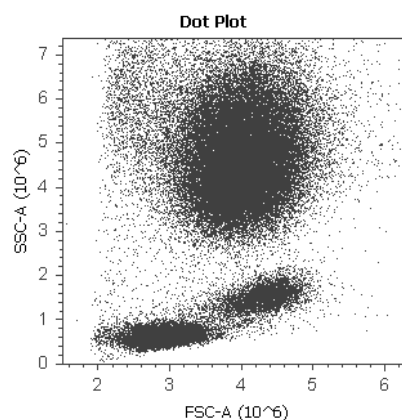


Figura 2: Exemplo de um gráfico dotplot. Cada ponto indica um evento, ou seja, uma partícula ou célula detectada pelo equipamento. O eixo x representa o forward scatter (tamanho relativo) e o eixo y representa o side scatter (complexidade celular). Fonte: Attune® Acoustic Focusing Cytometer -

User Guide, Life Technologies, disponível em:
http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?fullurl=http://tools.lifetechnologies.com:80/content/sfs/manuals/cms_082577.pdf

Nesse gráfico, os eventos são distribuídos conforme o seu forward scatter (FSC) e conforme o side scatter (SSC). Esses parâmetros são determinados pelo ângulo de espalhamento do laser. O FSC corresponde a espalhamentos da luz em pequenos ângulos, a luz ao ser refratada para a frente fornece indicativos do tamanho relativo da célula. SSC, por sua vez, corresponde a espalhamentos da luz em ângulos maiores, fornecendo indicativos sobre a granulosidade e complexidade estrutural do evento (Figura 3).

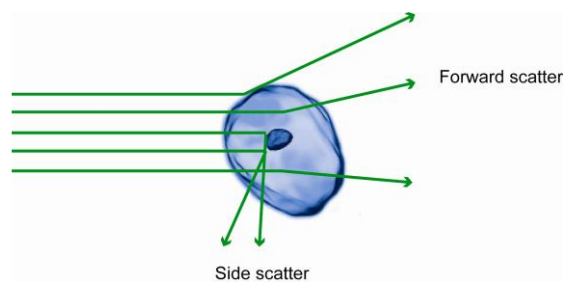


Figura 3: Representação dos espalhamentos da luz gerados pelo tamanho e pela complexidade celular. Os ângulos maiores de refração fornecem dados sobre tamanho, enquanto os ângulos menores de refração fornecem dados sobre a complexidade celular. Fonte: Attune® Acoustic Focusing Cytometer - User Guide, Life Technologies, disponível em: http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?fullurl=http://tools.lifetechnologies.com:80/content/sfs/manuals/cms_082577.pdf.

Encontrando as suas células no dotplot FSC x SSC

As células analisadas neste trabalho são provenientes de cultura simples, formada apenas por meio líquido, células de leveduras e pequenas sujidades inevitáveis, portanto, era esperado que as células fossem representadas no gráfico FSC x SSC pela população de maior tamanho e complexidade. Mesmo assim, realizou-se a confirmação da localização das leveduras no gráfico, antes de desenvolver os experimentos desse trabalho.

Como a levedura *S. cerevisiae* é uma célula pequena (4-6 μm), a leitura FSC x SSC é facilitada quando esses parâmetros são lidos na escala logarítmica (Figura 4).

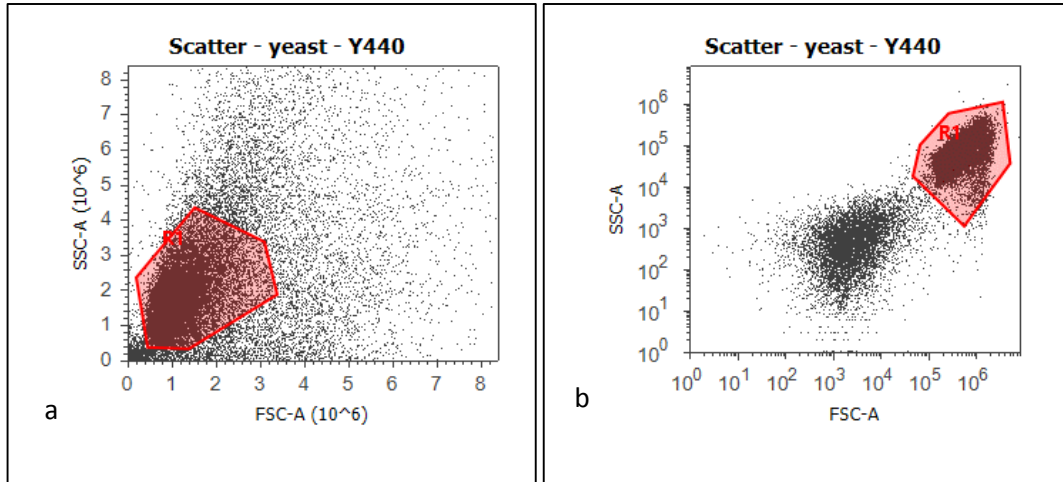


Figura 4: Escolha da escala do gráfico. Gráfico feito em escala linear, as duas populações formadas ficam próximas e difíceis de separar pelo *gate* (a). O gráfico lido em escala logarítmica, as duas populações formadas ficam nitidamente separadas (b).

As voltagens FSC e SSC devem ser ajustadas até que as populações observadas se separem.

Após o ajuste das voltagens, detectou-se a presença de duas populações diferentes (Figura 5).

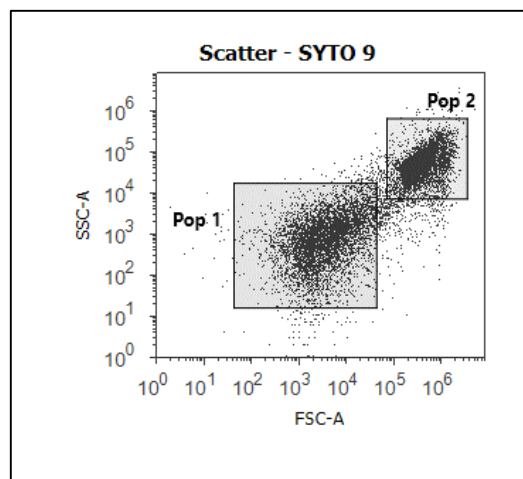


Figura 5: Detecção de duas populações no dotplot FSC x SSC. Cada população observada foi delimitada através da ferramenta “gate” do software. A população de menor tamanho e complexidade foi delimitada por um *gate* nomeado Pop 1 e a população de maior tamanho e complexidade foi delimitada por um segundo *gate* nomeado Pop 2.

Para confirmar qual delas tratava-se de leveduras, realizou-se a coloração da amostra com SYTO 9 - um corante fluorescente permeável a parede e membrana celular de levedura que se liga a ácidos nucleicos. Portanto, ao expor a amostra ao corante, a população correspondente às leveduras deveria se mostrar positivamente corada. Utilizou-se 1 µL de SYTO 9 3,34 mM para corar 1 mL de suspensão celular a 1×10^6 células/mL.

Para a leitura, o equipamento foi configurado para emitir o laser azul (488 nm) e coletar a fluorescência através dos detectores BL1 (530/30 nm).

Após realizar a leitura, as duas populações formadas foram separadas selecionando-as manualmente através da ferramenta “gate” do software, a população total foi dividida em *gate* “Pop 1” e *gate* “Pop 2” (Figura 5). Utilizando o software do equipamento, gerou-se histogramas filhos a partir de cada *gate* construído.

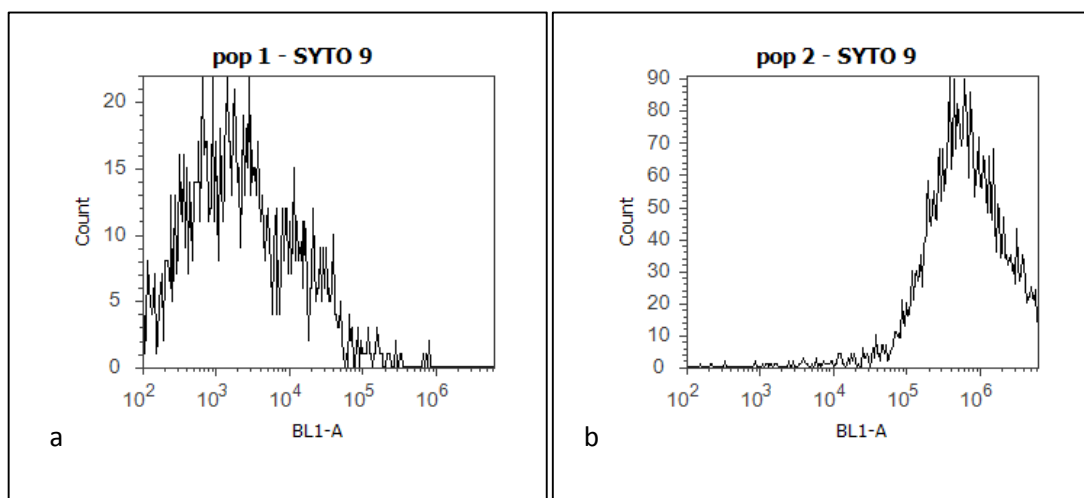


Figura 6: Histogramas referentes à emissão de fluorescência da População 1 (a) e da População 2 (b). A fluorescência do SYTO 9 foi coletada pelo filtro 530/30 nm, captada pelo detector BL1 do

equipamento. Os histogramas gerados correlacionam o número de eventos com a intensidade de fluorescência. Os eventos que aparecem próximos a 10^3 no eixo x (escala logarítmica de intensidade de fluorescência) representam eventos negativos, ou seja, eventos que não coraram com o fluoróforo. Eventos que aparecem próximos a 10^6 no eixo da intensidade de fluorescência são os eventos positivos, ou seja, eventos que coraram com o fluoróforo. Nota-se que o histograma gerado a partir da população 1 apresentou um pico na área negativa do histograma, ou seja, seus eventos não coraram com o fluoróforo. Enquanto os eventos da população 2, geraram um histograma com um pico positivo, ou seja, seus eventos coraram com o fluoróforo.

Analisando os histogramas formados, constatou-se que a população 2 é a população de interesse. Nela estão localizadas as leveduras, visto que houve emissão de fluorescência, pois o corante utilizado marca seu material genético. A população 1, selecionada pelo *gate* Pop 1 não emitiu fluorescência, constatou-se assim que ela é formada por *debris*. Dessa forma, todas análises e gráficos seguintes devem ser feitas a partir do *gate* da população de interesse, no caso Pop 2.

Depois que sua população foi identificada, pode-se utilizar a ferramenta “*Threshold*” para eliminar o *debris* do dotplot, criando-se um gráfico mais refinado. É importante ressaltar que esse é um parâmetro que deve ser configurado antes da gravação dos dados e que se trata de um recurso irreversível, portanto, deve-se atentar para que não haja perda dos eventos de interesse junto com o que fora excluído.

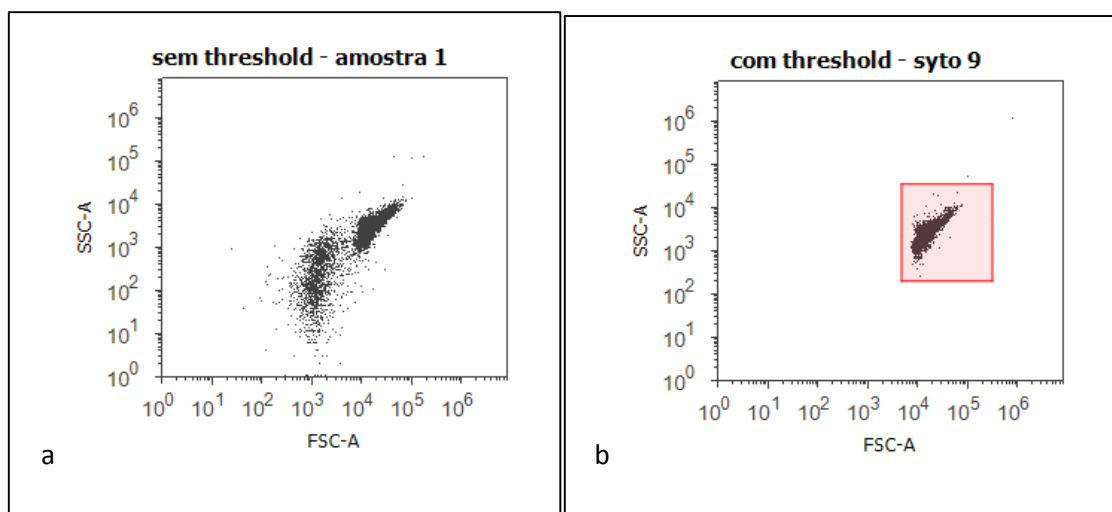


Figura 7: Exemplo do uso da ferramenta *Threshold*. À esquerda, está um dotplot salvo sem o uso da ferramenta (a). À direita, um dotplot salvo com o uso do *Threshold* que pode ser utilizado para eliminar o debris do gráfico (b).

Esse teste pode ser utilizado para qualquer material. Caso a amostra seja uma cultura composta - formada por células ou organismos distintos - ou trate-se de uma amostra coletada no meio ambiente - onde certamente haverá organismos distintos - deve-se escolher um corante específico para a população de interesse.